

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

GUILHERME AUGUSTO MARTINS DA SILVA

**Síntese Enzimática, Caracterização Físico-Química e Térmica de
Biodiesel de Sebo Bovino por Rota Etílica**

Lorena-SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GUILHERME AUGUSTO MARTINS DA SILVA

Síntese Enzimática, Caracterização Físico-Química e Térmica de
Biodiesel de Sebo Bovino por Rota Etílica

Dissertação apresentada a Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química.

Área de Concentração: Processos Catalíticos e
Biocatalíticos

Orientadora: Dra. Heizir Ferreira de Castro

Lorena- SP

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Silva, Guilherme Augusto Martins da

Síntese enzimática, caracterização físico-química e térmica de biodiesel de sebo bovino por rota etílica / Guilherme Augusto Martins da Silva; orientadora Heizir Ferreira de Castro.—Lorena: 2009.

97 f: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Biodiesel 2. Sebo bovino 3. Lipase 4. Etanol. I. Título.

577.152.9 - CDU

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente a minha mãe, Rosana Mary Martins, por todo o apoio e confiança em mim depositado, pelo carinho e atenção nos conselhos dados e pelo seu exemplo, me ensinando a importância do conhecimento na vida de um ser humano. Mãe, sem você nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A professora Heizir pela mais profunda dedicação, paciência, sinceridade e excelente orientação que certamente farão toda a diferença na minha formação.

Ao meu pai Antônio Luiz, pelo carinho e pelo apoio incessante em todas as etapas desse trabalho.

A minha Vó Cidinha pelos conselhos, pelo mais profundo carinho, afeto e dedicação em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Vinícius que por muitas vezes fez o papel de pai na minha jornada para a conclusão desse trabalho.

As minhas tias Silvana e Simone pela presença imprescindível na minha vida e durante toda a etapa dos meus estudos.

A todos os meus familiares que me apoiaram e acreditaram neste trabalho.

A minha colega Cibele pela presteza na realização das análises de infravermelho.

Aos professores Victor H. Perez, Júlio C. dos Santos pelos ensinamentos e experiência passados durante esses anos de convivência.

A professora Ana Paula pela ajuda na discussão das análises de termogravimetria, RMN e FTIR.

Aos meus amigos do Laboratório de Biocatálise, André, Matheus, Felipe, Renato, Daniel, e as minhas amigas, Patrícia, Larissa, Gisele, Ariela, Grazielle, Lívia, Aline e Ana Paula.

Em especial ao meu amigo André do Laboratório de Biocatálise que durante toda a execução deste trabalho foi companheiro e muito prestativo.

Aos meus irmãos que por vezes chamo-os de amigo, Diogo, Cassiano que embora distantes estão sempre presentes, e os meus amigos da banda, Lucas, Celso e Pimenta, pela grande amizade e afinidade.

A minha namorada Janaína Cescon, pela paciência, companheirismo, carinho incondicional e apoio absoluto durante esta fase da minha vida.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo.

RESUMO

SILVA, G. A. M. **Síntese enzimática, caracterização físico-química e térmica de biodiesel de sebo bovino por rota etílica**. 2009, 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2009.

O objetivo deste projeto foi estabelecer um processo de síntese enzimática de biodiesel empregando sebo bovino como matéria-prima lipídica. Para o desenvolvimento deste projeto de mestrado, o trabalho experimental foi direcionado para as seguintes atividades: 1) Determinação das propriedades físico-químicas da matéria-prima; 2) Testes de seleção do derivado imobilizado mais efetivo para mediar a síntese de biodiesel a partir do sebo bovino; 3) Estabelecimento de metodologias para analisar o produto transesterificado por diferentes técnicas; 4) Otimização da síntese de biodiesel por planejamento experimental; 5) Aumento de escala e comprovação do modelo estatístico e 6) Caracterização do produto formado e comparação com o biodiesel comercial. Os resultados das análises de composição da matéria-prima indicaram que a amostra de sebo bovino atende ao padrão exigido para ser utilizado na reação de transesterificação (baixo teor de água e índice de acidez). Para os testes de triagem do biocatalisador, diferentes fontes de lipase (EC 3.1.1.3) foram imobilizadas no suporte híbrido POS-PVA e utilizadas para mediar a reação de transesterificação do sebo bovino e etanol em meio isento de solventes. Todas as reações foram realizadas nas mesmas condições operacionais (temperatura de 45°C, razão molar de 1:9 (gordura/álcool) e 400 unidades de atividade enzimática por grama de sebo bovino). Os rendimentos de transesterificação, bem como os valores de produtividade, foram os parâmetros relevantes na escolha do biocatalisador mais efetivo. Os produtos transesterificados obtidos com rendimentos superiores a 90% foram ainda submetidos a análises complementares, tais como viscosidade cinemática, espectrometria de absorção na região do infravermelho e termogravimetria. O derivado imobilizado selecionado (*Pseudomonas cepacia*) foi caracterizado quanto às suas propriedades bioquímicas, cinéticas e de estabilidade térmica. Um planejamento experimental foi adotado para determinar a influência do pH e da temperatura na atividade enzimática. Para o estudo da cinética enzimática foram realizados experimentos com diferentes concentrações de substrato (azeite de oliva) visando determinar os parâmetros K_m e V_{max} na cinética de Michaelis-Menten. Um estudo da estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada foi realizado a 60°C para determinar a constante de desativação térmica. Na sequência, o derivado imobilizado selecionado foi utilizado para otimizar as variáveis do processo (temperatura e razão molar) empregando a metodologia de superfície de resposta, obtendo o seguinte modelo matemático para o rendimento de transesterificação: $Y = 86,89 - 7,46 x_1 - 2,04 x_2$ em que x_1 e x_2 são os valores codificados para as variáveis temperatura e razão molar, respectivamente. Com os resultados obtidos, as condições ótimas de reação foram determinadas por software (T= 48°C e razão molar 1:7 (sebo:etanol)) e então um experimento de comprovação do modelo foi realizado usando uma massa de 110 gramas de meio reacional. Os valores de rendimento da reação apresentaram uma boa correlação com os resultados preditos pelo modelo (91,62% em 8h de reação). Finalmente o produto obtido foi submetido a uma sequência de testes e análises para verificar o potencial do processo enzimático. Os testes indicaram que o processo enzimático é capaz de produzir biodiesel com boa qualidade, apesar de não atender plenamente as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Petróleo para uso de combustíveis no país.

Palavras chave: Biodiesel, Sebo-bovino, Etanol, Lipase.

ABSTRACT

SILVA, G. A. M. **Enzymatic synthesis, physico-chemical and thermal characterization of biodiesel from beef-tallow by ethyl route.** 2009, 97 f. Dissertation (Master of Science in Chemical Engineering) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2009.

The objective of this project was to establish a process for enzymatic synthesis of biodiesel using beef tallow and ethanol as feedstock. For the development of this project, the experimental work was directed to the following activities: 1) Determination of the physicochemical properties of the raw material; 2) Tests for selection of the most efficient immobilized derivative to mediate the biodiesel synthesis from beef tallow; 3) Methodology establishment for analyzing the product transesterificated by different techniques; 4) Optimization the synthesis of biodiesel by factorial design; 5) Mathematical model comprovation and increase the reaction mass 6) Characterization of the product formed and comparison with the industrial biodiesel. The results of analysis of composition of the raw materials indicated that the sample of beef tallow meets the standard required to be used in the transesterification reaction (low water content and acidity). For screening tests of biocatalysts, different sources of lipase (EC 3.1.1.3) were immobilized on POS-PVA support and used to mediate the transesterification of beef tallow and ethanol in solvent free medium. All reactions were performed under the same operating conditions (temperature of 45°C, molar ratio of 1:9 (fat/ alcohol) and 400 units of enzyme activity per gram of beef tallow). The transesterification yields and the productivity values were important parameters in choosing the most effective biocatalysts. Transesterificated products obtained with yields higher than 90% were subjected to additional tests, such as kinematic viscosity, infrared spectroscopy, thermogravimetry and ¹H NMR. The immobilized derivative selected (*Pseudomonas cepacia*) was characterized according to biochemical and kinetics properties and thermal stability. An experimental design was adopted to determine the influence of pH and temperature on enzyme activity. To study the enzyme kinetics experiments were performed with different concentrations of substrate (olive oil) to determine the parameters K_m and V_{max} in the Michaelis-Menten kinetics. A study of thermal stability of free and immobilized lipase was performed at 60 °C to determine the constant of thermal deactivation. Following this, the chosen immobilized derivative was used to optimize the transesterification reaction (temperature and molar ratio) via response surface methodology, obtaining the following mathematical model ($Y=86.89-7.46x_1-2.04x_2$) for the transesterification yield, where x_1 and x_2 are the coded values for the variables temperature and molar ratio, respectively. Optima reaction conditions were determined by software (T = 48 ° C and molar ratio of 1:7 (tallow: ethanol)) and then a trial to confirm the mathematical model was performed using 110 g of reaction medium. The yield value showed good correlation with results predicted by the model (91.62% in 8 h reaction). Finally, the product was submitted to a sequence of tests and analysis to verify the potential of the enzymatic process. The tests indicated that the enzymatic process allows producing biodiesel with good quality, although the specifications recommended by the Brazilian Petroleum Agency (ANP) to be used as biofuel were not fully attained.

Keywords: Biodiesel, Beef-tallow, Ethanol, Lipases

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Dados estatísticos da produção de biodiesel dos últimos 4 anos (milhões de litros)..... 17
- Figura 2.1.** Reservas de petróleo segundo regiões geográficas – 2003 (bilhões de barris). . 20
- Figura 2.2.** Distribuição das matérias-primas oleaginosas para produção de biodiesel no território brasileiro..... 22
- Figura 2.3.** Potencial de participação de diferentes matérias-primas lipídicas na produção de biodiesel no Brasil. 23
- Figura 2.4.** Equação geral da transesterificação de triacilglicerol com álcool..... 26
- Figura 2.5.** Reação de transesterificação de matéria-prima lipídica contendo elevada concentração de ácidos graxos livres via catálise ácida. 27
- Figura 2.6.** Fluxograma do processo de transesterificação química catalisada por álcali. ... 29
- Figura 2.7.** Fluxograma do processo de transesterificação enzimática..... 29
- Figura 3.1.** Reator de vidro utilizado para síntese de biodiesel nos testes de triagem da fonte de lipase. 44
- Figura 3.2.** Reator com agitação mecânica e condensador de refluxo..... 46
- Figura 3.3.** Processo de decantação do biodiesel..... 46
- Figura 4.1.** Perfil de formação dos ésteres de etila (-■-C14; -●-C16, -▲-C18, -▼- C18:1, – Total) em função do tempo de reação da etanolise do sebo bovino catalisada por diferentes lipases imobilizadas em POS-PVA. Todos os ensaios foram realizados a 45°C, sob agitação magnética. Lipase PS (a), Lipase AK (b), Lipolase (c), lipase Pancreática (d), Piccantase R8000 (e)..... 59
- Figura 4.2.** Espectro na região do infravermelho das amostras de sebo bovino refinado e do biodiesel sintetizado pelas lipases PS e AK. 61
- Figura 4.3.** Análise termogravimétrica das amostras de sebo bovino (linha vermelha) e do biodiesel sintetizados pela atuação das lipases PS (linha verde) e AK (linha azul). (a) TG, (b) DTG..... 63
- Figura 4.4.** Ressonância magnética nuclear de prótons das amostras de sebo bovino e do biodiesel sintetizado pelas lipases PS e AK. 65

- Figura 4.5.** Superfície de resposta de acordo com a equação predita para a atividade hidrolítica da lipase PS livre..... 68
- Figura 4.6.** Superfície de resposta de acordo com a equação predita para a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada. 68
- Figura 4.7.** Atividade hidrolítica da lipase de *Pseudomonas cepacia* livre em função da concentração do substrato..... 70
- Figura 4.8.** Atividade hidrolítica da lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em função da concentração do substrato..... 70
- Figura 4.9.** Desativação térmica da lipase PS livre e imobilizada em POS-PVA (experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 sob temperatura de 60 °C, considerando como 100% a atividade da lipase livre em 43290 U/g e do derivado imobilizado em 2009 U/g)..... 71
- Figura 4.10.** Espectro na região do infravermelho da lipase PS livre e imobilizada em POS-PVA. 72
- Figura 4.11.** Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C14; -●-C16, -▲-C18, -▼-C18:1, -◆-Total) na reação de transesterificação do sebo bovino empregando lipase PS imobilizada em POS-PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaios 1 a 6). 74
- Figura 4.11.** Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C14; -●-C16, -▲-C18, -▼-C18:1, -◆-Total) na reação de transesterificação do sebo bovino empregando lipase PS imobilizada em POS-PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaios 7 a 11). 75
- Figura 4.12.** Superfície de resposta para o rendimento de transesterificação do sebo bovino e etanol catalisada pela lipase PS imobilizada em POS-PVA em função da temperatura e razão molar, de acordo com o modelo predito pela equação 4.1. 77
- Figura 4.13.** Rendimento de transesterificação em função dos resultados obtidos pelo planejamento experimental..... 77
- Figura 4.14.** Análise termogravimétrica das amostras de biodiesel obtidas na reação transesterificação do sebo bovino com etanol catalisada pela lipase PS imobilizada em diferentes condições reacionais. 78
- Figura 4.15.** Análise termogravimétrica comparativa das amostras de biodiesel sintetizadas pela lipase PS, observando o efeito da temperatura. 79
- Figura 4.16.** Análise termogravimétrica comparativa das amostras de biodiesel sintetizadas pela lipase PS, observando o efeito da razão molar. 79

Figura 4.17. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C14; -●-C16, -▲-C18, -▼-C18:1, -◆-Total) na reação de transesterificação do sebo bovino empregando lipase PS immobilizada em POS-PVA nas condições preditas pelo modelo estatístico. 80

Figura 4.18. Análise termogravimétrica da amostra de biodiesel obtido na reação de comprovação do modelo estatístico (48°C e razão molar 1:7 sebo/etanol) empregando a lipase PS como catalisador..... 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Principais vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático para a produção de biodiesel.	28
Tabela 2.2 - Ácidos graxos presentes no sebo bovino.	36
Tabela 2.3 - Propriedades dos principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras.	36
Tabela 2.4 - Dados comparativos entre as propriedades do biodiesel metílico obtido de diferentes matérias-primas e o diesel mineral.	37
Tabela 2.5 - Aplicação de técnicas termoanalíticas para determinação de propriedades dos combustíveis.	40
Tabela 3.1 - Equipamentos utilizados.	42
Tabela 3.2 - Propriedades morfológicas do suporte POS-PVA quanto à área superficial, volume de poros e tamanho médio dos poros.	43
Tabela 3.3 - Níveis reais e codificados para as variáveis temperatura e razão molar, avaliados segundo planejamento experimental estrela rotacional.	45
Tabela 3.4 - Níveis reais e codificados para as variáveis temperatura e pH, avaliados segundo planejamento experimental estrela rotacional.	47
Tabela 3.5 - Condições para determinação dos ésteres de etila.	52
Tabela 4.1 - Propriedades do sebo bovino refinado.	55
Tabela 4.2 - Atividade hidrolítica, teor de proteínas e atividade específica das lipases testadas.	56
Tabela 4.3 - Atividades hidrolítica e sintética dos derivados imobilizados em POS-PVA e rendimento de imobilização.	57
Tabela 4.4 - Resumo dos experimentos realizados utilizando diferentes lipases imobilizadas em POS-PVA ativado com epícloridrina.	60
Tabela 4.5 - Viscosidade do sebo bovino e das amostras de biodiesel obtidas nas reações catalisadas pela lipase PS e AK.	61
Tabela 4.6 - Etapas e temperaturas de degradação térmica para as amostras de sebo bovino, biodiesel sintetizado pela atuação das lipases PS e AK.	64

Tabela 4.7 -	Resultados obtidos no planejamento experimental para avaliação do efeito das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da lipase PS livre e imobilizada.	67
Tabela 4.8 -	Estimativas dos efeitos das variáveis, erro padrão e valores de p para a atividade hidrolítica da lipase PS livre e imobilizada segundo os resultados dos planejamentos.	67
Tabela 4.9-	Modelos obtidos pela superfície de resposta gerada no planejamento experimental estrela rotacional, considerando a atividade enzimática (A , U/g) como função dos valores codificados de pH (x_1) e temperatura (x_2).	68
Tabela 4.10 -	Análise de variância (ANOVA) para a atividade hidrolítica da lipase PS livre.	69
Tabela 4.11 -	Análise de variância (ANOVA) para a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada em POS-PVA.....	69
Tabela 4.12 -	Valores de k_m e V_{max} obtidos a partir das curvas da atividade hidrolítica em função da concentração de substrato.	70
Tabela 4.13 -	Constantes de inativação térmica da lipase livre e imobilizada e seus respectivos tempos de meia-vida.	71
Tabela 4.14 -	Características bioquímicas e cinéticas das preparações de lipase PS livre e imobilizada em POS-PVA.....	72
Tabela 4.15 -	Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial 2^2 estrela rotacional utilizado para avaliar a influência das variáveis: temperatura e razão molar no rendimento da transesterificação do sebo bovino e etanol.....	73
Tabela 4.16-	Estimativas dos efeitos das variáveis, erro padrão e valores de p para o rendimento de transesterificação segundo os resultados do planejamento estrela rotacional.	76
Tabela 4.17 -	Análise de variância (ANOVA) para os rendimentos de transesterificação do sebo bovino com etanol.	76
Tabela 4.18 –	Comparação das propriedades do biodiesel e adequação a norma vigente.	81

ÍNDICE DE SIGLAS

AK – Lipase de *Pseudomonas fluorescens*

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ASTM – American Society for Testing and Materials

CG – Cromatografia Gasosa

DTG – Termogravimetria diferencial

FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Kd – Constante de desativação térmica

Km – Constante de afinidade da enzima pelo substrato, constante de Michaelis-Menten

OGR – Óleos e gorduras residuais

PEG – Polietilenoglicol

POS-PVA – Polissiloxano - álcool polivinil

PS – Lipase de *Pseudomonas cepacia*

t_{1/2} – Tempo de meia vida

TAG – Triacilgliceróis

TEOS – Tetraetilortossilicato

TG – Termogravimetria

V_{max} – Velocidade máxima de reação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Matriz energética.....	20
2.2. Matérias-primas para produção de biodiesel	22
2.3. Óleos vegetais e gorduras como fonte de energia renovável.....	23
2.4. Reação de transesterificação para produção de biodiesel	25
2.5. Transesterificação enzimática	27
2.6. Utilização de lipases imobilizadas como catalisadores.....	30
2.7. Processos de obtenção de biodiesel por via enzimática.....	31
2.8. Propriedades do biodiesel.....	33
2.9. Métodos analíticos para quantificação da qualidade do biodiesel.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1. Enzimas	41
3.2. Suporte de imobilização.....	41
3.3. Matérias-primas	41
3.4. Amostra de biodiesel	41
3.5. Outros materiais e reagentes	41
3.5. Equipamentos	42
3.6. Procedimento experimental.....	42
3.6.1. Síntese e ativação do suporte híbrido POS-PVA.....	42
3.6.2. Imobilização de lipases de diferentes fontes no suporte híbrido	43
3.6.3. Testes de triagem da lipase mais efetiva para efetuar a síntese de biodiesel	43
3.6.4. Otimização da transesterificação enzimática de sebo bovino e etanol por planejamento experimental	44
3.6.5. Comprovação do modelo estatístico	45
3.6.6. Separação dos ésteres (recuperação do glicerol)	46
3.7. Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas do derivado imobilizado selecionado	47
3.7.1. Propriedades bioquímicas.....	47
3.7.2. Parâmetros cinéticos da lipase livre e imobilizada	47
3.7.3. Estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada.....	48
3.8. Métodos de análises.....	48
3.8.1. Características da matéria-prima (sebo bovino)	48
3.8.1.1. Índice de Acidez (I.A.)	48
3.8.1.2. Índice de Peróxido (I.P.).....	49
3.8.1.3. Índice de Saponificação (I.S.).....	49
3.8.1.4. Índice de Iodo (I.I.).....	50
3.8.2. Determinação das propriedades da lipase livre e imobilizada	50
3.8.2.1. Teor de proteína.....	50
3.8.2.2. Atividade hidrolítica da lipase e derivados imobilizados	51
3.8.2.3. Atividade sintética dos derivados imobilizados.....	51
3.8.3. Análises do biodiesel.....	52
3.8.3.1. Determinação dos ésteres formados na reação de etanólise da gordura animal.....	52
3.8.3.2. Análise de viscosidade do sebo bovino e do biodiesel	53
3.8.3.3. Análise Termogravimétrica	53
3.8.3.4. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	53

3.8.3.5 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Caracterização da matéria-prima.....	55
4.2. Imobilização de lipases de diferentes fontes no suporte híbrido POS-PVA.....	56
4.3. Seleção do derivado imobilizado para mediar a transesterificação do sebo bovino com etanol	58
4.4. Análise do produto transesterificado (biodiesel)	60
4.4.1. Viscosidade cinemática	60
4.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho.....	61
4.4.3. Análise termogravimétrica	62
4.4.4. Ressonância magnética nuclear de próton.....	64
4.5. Propriedades bioquímicas, cinéticas do derivado selecionado para aplicação na reação de transesterificação do sebo bovino.	66
4.5.1. Propriedades bioquímicas.....	66
4.5.2. Parâmetros cinéticos.....	69
4.5.3. Constante de desativação térmica da lipase livre e imobilizada	70
4.5.4. Espectro na região do Infravermelho.....	71
4.6-Otimização das condições de transesterificação enzimática do sebo bovino com etanol catalisada pela lipase PS imobilizada em POS-PVA.....	73
4.7- Estabilidade térmica das amostras de biodiesel.....	78
4.8- Comprovação do modelo estatístico da síntese de biodiesel catalisada pela lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> e análise do produto obtido	80
4.8.1- Comprovação do modelo estatístico.....	80
4.8.2 Comparação das propriedades do biodiesel obtido por vias enzimática e química	81
4.8.3 Análise termogravimétrica	82
4.9- Análise da viabilidade técnica da produção de biodiesel derivado de sebo bovino.....	83
5. CONCLUSÃO.....	85
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com sua logística sustentada nas malhas rodoviárias e, conseqüentemente, o consumo de diesel, pelas frotas (1,434 milhão de caminhões) é significativo (ANTT, 2009). Esse elevado consumo, aliado ao impacto ambiental decorrente da emissão, principalmente, de particulados e os custos de importação de uma fração do diesel, requer pesquisas que proporcionem alternativas para melhorar este cenário, tanto no aspecto econômico quanto no aspecto ambiental.

A busca por combustíveis alternativos é incessante e se intensificou nos últimos anos, principalmente pela volatilidade do preço do barril de petróleo que alcançou valores próximos a U\$150,00 no primeiro trimestre de 2008, fechando o ano abaixo dos US\$ 60,00. O etanol brasileiro, por exemplo, obtido pelo processo de fermentação de matérias-primas sacaríneas (caldo de cana-de-açúcar e melaço), vem sendo utilizado como alternativa aos combustíveis derivados do petróleo desde 1980. No cenário atual, outras tecnologias que se destacam são: (i) o H-BIO, tecnologia desenvolvida pela Petrobrás, na qual o óleo vegetal *in-natura* é hidrogenado e adicionado ao diesel mineral e (ii) o biodiesel, mono-álquil ésteres de ácidos graxos derivados de matérias-primas lipídicas, como óleos vegetais ou gorduras animais, obtidos pela reação de transesterificação com álcool de cadeia curta (VASUDEVAN; BRIGGS, 2005).

Entre essas tecnologias, a produção de biodiesel é considerada área prioritária para desenvolvimento no país desde 2002 quando foi anunciado pelo Governo Federal o Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel (PROBIODIESEL), tendo como objetivo estabelecer um arcabouço regulatório para o desenvolvimento e a produção nacional de biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006). Baseado neste programa, o governo brasileiro em 13 de janeiro de 2005 publicou a Lei 11.097 que estabelece o uso obrigatório comercial de misturas com 2% de biodiesel e 98% de óleo diesel (mistura B2) para início de 2008, atualmente em vigor a mistura B3, esperando-se para 2013 o aumento da participação do biodiesel para 5% (B5) (PNPB, 2008). Esta iniciativa tem estimulado a produção nacional de biodiesel, que segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), passou de 69 mil m³ em 2006 para 402 mil m³ em 2007, fechando o ano de 2008 com mais de 1 milhão de m³ (ANP, 2009).

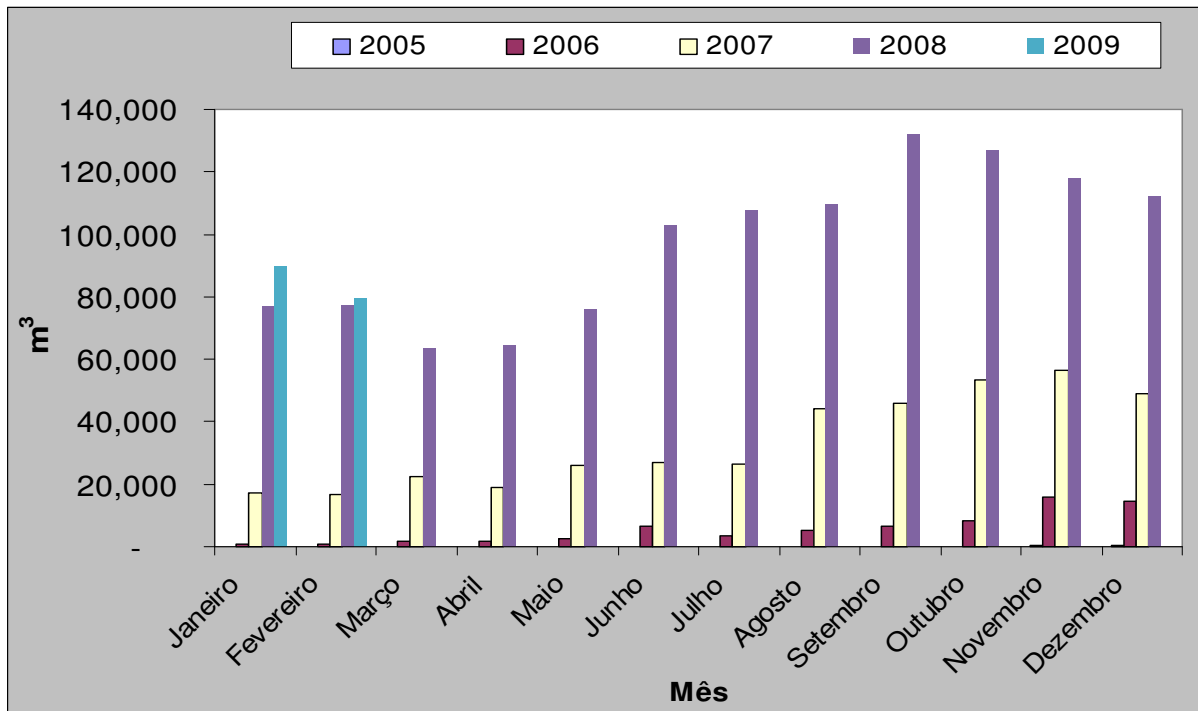


Figura 1.1. Dados estatísticos da produção de biodiesel dos últimos 4 anos (milhões de litros).

Fonte: ANP, 2009.

A metodologia comercial de obtenção de biodiesel utiliza frequentemente catalisadores homogêneos (alcalinos ou ácidos) para a transesterificação do óleo ou gordura, na presença de metanol, produzindo ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerol. No Brasil, a opção de desenvolver um processo de obtenção de biodiesel a partir de etanol, representará uma independência do modelo dominante de obtenção de biodiesel europeu e americano que seguem a rota tecnológica metílica.

No que se refere a produção de biodiesel por transesterificação tanto por catálise homogênea como heterogênea, verifica-se, individualmente, vantagens e desvantagens que justificam um estudo detalhado para uma escolha adequada em função das prioridades técnicas e/ou econômicas envolvidas.

Os catalisadores básicos usados na transesterificação homogênea incluem NaOH, KOH, carbonatos e alcóxidos (SCHUCHARDT; SERCHEL; VARGAS, 1998), entretanto o NaOH é o catalisador mais usado tanto por razões econômicas como pela sua disponibilidade no mercado. A reação de transesterificação catalisada por esta base é aproximadamente 4000 vezes mais rápida que a ácida, sendo mais apropriada do ponto de vista comercial. Entretanto, a rota por catalisador homogêneo acarreta dificuldades na separação, formação de sabões, elevado teor residual de sódio e elevado índice de acidez, dentre outros inconvenientes. A

síntese de biodiesel empregando catalisador heterogêneo significa oportunidade concreta de recuperação do catalisador, elimina os problemas de separação, índice de acidez e teor de sódio verificados no processo anterior. Além disso, o uso de catalisador heterogêneo minimiza os problemas relativos às etapas finais de purificação do biodiesel, pois reduz a ocorrência das reações indesejáveis de saponificação e permite uma simplificação e redução dos custos dos processos pela diminuição do número de operações associadas. Várias pesquisas recentes relacionadas a alcoólise de triglicerídeos envolvem o uso de catalisadores heterogêneos, como por exemplo, zeólitas básicas, óxidos e carbonatos de metais alcalino-terrosos e enzimas, em particular lipases (PINTO *et al.*, 2005; ROZYCKI *et al.*, 2006; AKO *et al.*, 2008).

A rota enzimática vem sendo investigada no país por diversos pesquisadores, incluindo o Grupo de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) que, desde 2003, vem estudando a síntese enzimática de biodiesel empregando óleos vegetais de baixo custo, como os óleos de babaçu e palma (URIOSTE, 2004; SILVA; VIEIRA; CASTRO, 2005; MENDES; VIEIRA; CASTRO, 2006; PAULA *et al.*, 2007; MOREIRA, 2007; MOREIRA *et al.*, 2007; DA RÓS, 2009). Os resultados obtidos são altamente promissores referentes à aplicação de lipases estabilizadas em suporte não comercial híbrido constituído de polissiloxano-álcool polivinil (POS-PVA), demonstrando que os produtos obtidos atendem as especificações exigidas pela Agência Nacional de Petróleo para uso como biocombustível (MOREIRA *et al.*, 2007).

Para dar seqüência a essa linha de pesquisa, o presente projeto contempla a síntese enzimática de biodiesel empregando, como modelo de estudo, o sistema reacional sebo bovino e etanol. O sebo bovino foi selecionado como fonte de triglicerídeos por inúmeras razões. A primeira delas, e talvez a mais importante, é o fato do sebo bovino não ser uma matéria prima de consumo humano direto, ou seja, não compete com a indústria de alimentos como o óleo de soja, por exemplo. O aspecto econômico é a outra razão importante para a escolha do sebo bovino, uma vez que essa matéria lipídica é considerada um resíduo e, portanto, apresenta um custo bem inferior quando comparada com outras matérias-primas disponíveis atualmente para a produção de biodiesel no Brasil. Finalmente, com relação à disponibilidade da matéria prima, a oferta nacional de sebo bovino é estimada em torno de 600 mil toneladas/ ano, sendo, portanto, uma fonte sustentável para a produção do biocombustível em função da ascensão da indústria de processamento de carne bovina, resultando na vantagem de reduzir o impacto poluidor desse subproduto que é gerado na própria indústria agropecuária.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um processo de síntese enzimática de biodiesel pela rota etílica, empregando sebo bovino como matéria-prima lipídica e lipase imobilizada como catalisador. Para tanto foram realizadas as seguintes etapas: 1) Seleção do sistema imobilizado na reação de transesterificação do sebo bovino com etanol, sem adição de solventes, tomando como parâmetros a velocidade de formação dos ésteres e rendimento de reação; 2) Estabelecimento das condições de transesterificação, empregando o sistema imobilizado selecionado em função das variáveis que interferem no processo, tais como: temperatura e razão molar etanol/ sebo bovino, visando propor um modelo que represente a eficiência do processo em função das variáveis selecionadas, utilizando a técnica de planejamento experimental; 3) Comprovação do modelo estatístico e caracterização físico-química e térmica do produto transesterificado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Matriz energética

A demanda de energia, sempre crescente no atual mundo industrializado, e os problemas de poluição causados pelo uso de combustíveis fósseis levam à necessidade do desenvolvimento de fontes de energia renováveis e de menor impacto ambiental que as tradicionais. Este fato tem gerado um interesse por fontes alternativas para a substituição dos combustíveis oriundos do petróleo. Além disso, deve-se considerar que as reservas mundiais de petróleo são limitadas. A Figura 2.1 identifica, no mapa mundial, as reservas de petróleo existentes em 2003.

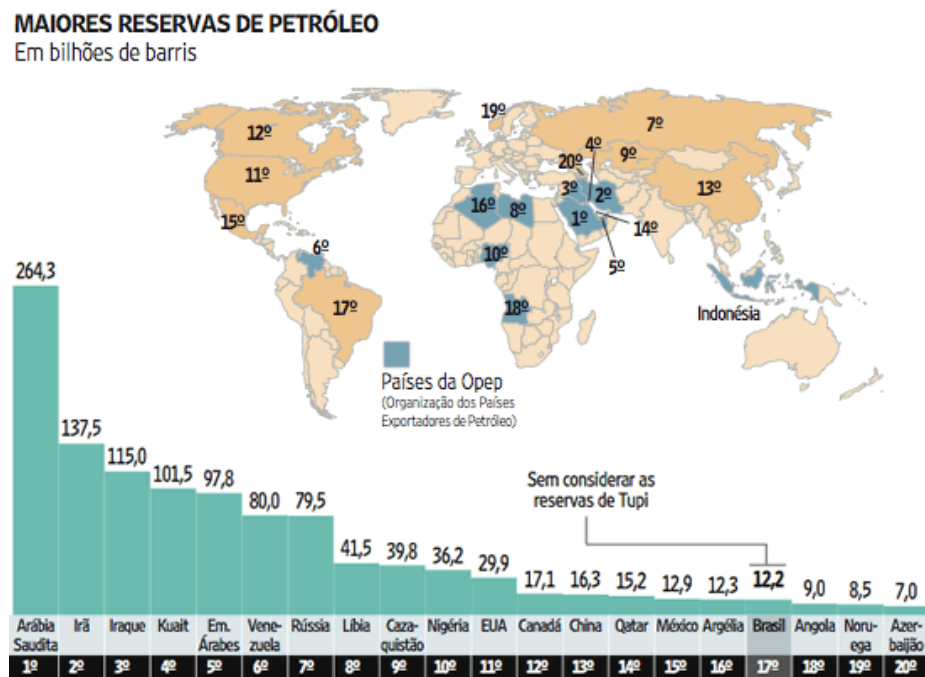


Figura 2.1. Reservas de petróleo segundo regiões geográficas – 2003 (bilhões de barris).
Fonte: Ultraperiferias, 2008.

Biomassa, bagaço de cana-de-açúcar, energia eólica e solar, álcool e o biodiesel são, portanto, algumas fontes de energia limpa e que precisam ser melhor aproveitadas para construção de um desenvolvimento com sustentabilidade (METZGER, 2001). Estudos atuais apontam que a utilização da biomassa para fins energéticos vem tendo uma participação crescente perante a matriz energética mundial, permitindo estimar que, até o ano de 2050, o uso mundial de biomassa disponível deverá ser duas vezes maior do que a atual (FISCHER; SCHRATTENHOLZER, 2001).

No Brasil, em 2007, o consumo de etanol foi da ordem de 16,47 bilhões de litros e essa demanda vem aumentando de forma a tornar o mercado interno o principal motor da produção (CONAB, 2008). Nesse sentido, diversos trabalhos de pesquisa vêm sendo desenvolvidos visando aumentar a produtividade do etanol, sem aumentar a área plantada de cana-de-açúcar utilizando, por exemplo, como matéria-prima o bagaço excedente gerado nas plantas sucroalcooleiras.

Outra tecnologia desenvolvida como fonte alternativa ao combustível fóssil é a hidrogenação da mistura de diesel mineral com óleo vegetal denominada H-BIO. As vantagens da utilização desse método são inúmeras e dentre elas destacam-se o aumento da qualidade do óleo diesel com teores reduzidos de enxofre e a não geração de subprodutos. Porém, os problemas da utilização de combustíveis fósseis não são totalmente resolvidos em razão do H-BIO ser apenas uma mistura com o diesel fóssil. Assim, a produção do biodiesel está inserida em um processo cíclico que auxilia na minimização do efeito estufa, uma vez que possibilita um equilíbrio entre a massa de carbono fixada no combustível e aquela liberada na combustão. Adicionalmente, quando se utiliza álcool de origem mineral na produção de biodiesel (rota metálica), somente uma parte do CO₂ é reabsorvido; por outro lado, quando se utiliza álcool de origem vegetal (rota etélica), a reabsorção ocorre na íntegra.

No aspecto ambiental, as vantagens da utilização do biodiesel são também significativas. Entre elas, é pertinente destacar que, o biodiesel apresenta baixa toxicidade, é biodegradável, em geral não contém enxofre e compostos aromáticos e reduz significativamente a emissão de gases, como o monóxido de carbono (RAMOS *et al.*, 2003). A ausência de enxofre na composição química do biodiesel confere outra grande vantagem: não há emissões de gases sulfurados (SO_x), característicos em motores movidos a derivados de petróleo, o que contribui, efetivamente, para a minimização do fenômeno da chuva ácida (CHANG *et al.*, 1996). Além disso, diferentemente do combustível fóssil, o CO₂ liberado na queima do biodiesel é reciclado por absorção durante o crescimento da massa vegetal por meio da fotossíntese (SHEEHAN *et al.*, 1998).

A implantação de um programa energético como o biodiesel, abre oportunidades para grandes benefícios sociais decorrentes do alto índice de geração de emprego por capital investido, culminando com a valorização do campo e a promoção do trabalhador rural, além das demandas por mão-de-obra qualificada para o processamento (OLIVEIRA; COSTA, 2001).

2.2. Matérias-primas para produção de biodiesel

As matérias-primas para a produção de biodiesel podem ser de diferentes origens: óleos vegetais, gorduras animais e óleos e gorduras residuais (OGR).

Em todo o mundo, as matérias lipídicas mais típicas para a produção de biodiesel são os óleos refinados. A escolha da matéria-prima é de grande importância no processo de produção uma vez que leva-se em conta a disponibilidade, o custo, as propriedades de armazenamento e o seu desempenho como combustível (DUARTE, 2009). Na União Européia, por exemplo, emprega-se, para a produção de biodiesel, os óleos de colza e girassol e nos Estados Unidos o óleo de soja e as gorduras animais (KNOTHE *et al.*, 2006).

O Brasil apresenta uma ampla variedade de culturas oleaginosas, que com o Programa Nacional de Biodiesel, podem favorecer o pequeno produtor e promover o desenvolvimento em regiões mais distantes dos grandes centros urbanos e tecnológicos do país. A Figura 2.2 mostra a variedade de matérias-primas e como essas culturas estão distribuídas pelo mapa geográfico brasileiro.



Figura 2.2. Distribuição das matérias-primas oleaginosas para produção de biodiesel no território brasileiro.

Fonte: Biodieselbr, 2009.

Entre as gorduras animais que são possíveis de serem transformadas em biodiesel, merecem destaque o sebo bovino, os óleos de peixes, a banha de porco, gordura de frango,

entre outras matérias graxas. Outra possibilidade de produção do biodiesel é a reutilização de óleos e gorduras vegetais residuais (OGR) de processos de fritura de alimentos, que tem se mostrado atraente na medida em que aproveita o óleo vegetal como combustível após sua utilização alimentar (WUST, 2004; HAAS, 2005). Observa-se que uma pequena porcentagem dos OGR vem sendo coletada para a fabricação de sabão ou de rações para animais, sendo que a maior parte ainda é eliminada através do sistema de esgoto e lixo, gerando uma carga adicional para o tratamento de esgoto. O combustível produzido a partir de OGR apresenta vantagens do ponto de vista ecológico com relação ao óleo diesel derivado do petróleo, e vantagens com relação ao custo quando comparado ao biodiesel padrão produzido a partir do óleo de colza. Em comparação com o diesel, o éster de OGR possui a vantagem de não emitir, na combustão, compostos de enxofre, além de ser rapidamente biodegradável no solo e na água (KNOTHE *et al.*, 2006).

Recentemente, o sebo bovino tem se revelado como uma promissora fonte de matéria prima para produção industrial de biodiesel devido a sua alta produção e baixo custo de comercialização. Essa matéria-prima tem potencial para contribuir com uma parcela de 10% na produção industrial de biodiesel (Figura 2.3). Atualmente, duas plantas industriais de produção de biodiesel com o emprego do sebo bovino já estão operando no país com capacidade de 50 kt/ano (Usina Barraálcool – Mato Grosso) e 100kt/ano (Usina Bertini – São Paulo).

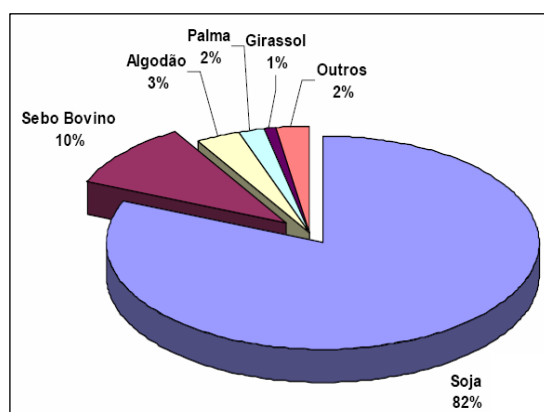


Figura 2.3. Potencial de participação de diferentes matérias-primas lipídicas na produção de biodiesel no Brasil.

Fonte: Faleiros, 2007.

2.3. Óleos vegetais e gorduras como fonte de energia renovável

Os componentes de óleos e gorduras são os triacilgliceróis (TAG). Quimicamente, os TAG são ésteres de ácidos graxos com glicerol (1,2,3-propanotriol). Os TAG de óleos

vegetais e gorduras animais contêm, tipicamente, diferentes tipos de ácidos graxos. Como cada ácido graxo apresenta propriedades químicas peculiares, o perfil da composição dos ácidos graxos presentes nos óleos e gorduras ditará as propriedades físicas e químicas da matéria-prima como, por exemplo, viscosidade, ponto de fusão e estabilidade à oxidação (KNOTHE, 2005).

Entretanto, a utilização direta de óleos vegetais em motores a diesel é muito problemática. Estudos efetuados em diversos óleos vegetais mostraram que a sua combustão direta conduz à carbonização na cabeça do injetor, resistência à injeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do Carter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas. As causas desses problemas foram atribuídas à polimerização dos triglicerídeos, por meio de suas ligações duplas, que conduzem à formação de depósitos, assim como a baixa volatilidade e a alta viscosidade dos óleos vegetais que conduzem a problemas na atomização do combustível (COSTA NETO; ROSSI, 2000; RAMOS *et al.*, 2003).

Tecnicamente, vários estudos têm sido conduzidos para desenvolver derivados de óleos vegetais, cujas propriedades e desempenho se aproximam do óleo diesel. Um combustível alternativo deve ter uma técnica praticável, ser economicamente competitivo, ambientalmente aceitável e prontamente disponível (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

Três processos podem ser destacados para adequar o uso de óleos e gorduras como combustíveis: Pirólise, Micro-emulsificação e a Transesterificação.

Pirólise é a conversão química causada pela adição de energia térmica, na presença de nitrogênio (GROSSLEY; HEYES; HUDSON, 1962; BILLAUD; DOMINGUEZ; BROUTIN, 1995). Embora o produto da pirólise seja similar ao diesel proveniente do petróleo, a remoção do oxigênio durante o processo térmico elimina qualquer benefício ambiental do produto (MA; HANNA, 1999).

As microemulsões são formadas por três tipos de componentes: óleo, álcool e um composto anfifílico. Os compostos anfifílicos são selecionados principalmente por sua capacidade de emulsificar as misturas de óleo/ álcool, mas sua estrutura também contribui nas propriedades finais do combustível formulado. A formulação de um combustível híbrido, tal como as microemulsões, são geralmente mais baratas de se preparar do que o biodiesel, uma vez que se usa a simples tecnologia de misturar os componentes em temperatura ambiente. Todavia, apesar das microemulsões apresentarem boas características, no que diz respeito aos padrões de atomização, verificou-se que, em longo prazo, provocam a deposição de carbono no motor, a combustão incompleta e o aumento da viscosidade dos óleos lubrificantes (KNOTHE *et al.*, 2006).

A transesterificação é a mais comum e considerada a melhor rota para a utilização dos óleos vegetais e gorduras como alternativa ao diesel fóssil, pois confere ao produto (biodiesel) características como viscosidade, índice de cetano muito próximas das do diesel. Os óleos vegetais, quando submetidos ao processo de transesterificação, sofrem quedas bruscas nos valores do ponto de névoa e viscosidade, podendo, assim, com o combustível obtido, ser queimado diretamente em motores diesel sem a necessidade de adaptação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

2.4. Reação de transesterificação para produção de biodiesel

Para a reação de interesse, ou seja, transesterificação de óleos e gorduras para produção de biodiesel, utiliza-se um álcool de cadeia curta, normalmente o metanol ou etanol, uma fonte de triglicerídeos e um catalisador.

De modo geral, denomina-se transesterificação um conjunto de reações que utilizam um triglicerídeo como reagente comum. Existe um conjunto de reações de transesterificação, que diferem entre si de acordo com a substância que reage com o triglicerídeo. Quando se emprega um éster, a transesterificação é chamada de interesterificação, quando emprega um ácido é chamada acidólise, quando emprega o glicerol é chamada de glicerólise e quando se emprega um álcool chama-se alcoólise. Nesse último caso, a reação é utilizada para produção de biodiesel, obtendo-se glicerol como subproduto (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Os álcoois que podem ser utilizados são o metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol, principalmente pelo custo e suas propriedades físico-químicas (menor cadeia carbônica) (MACEDO; MACEDO, 2004).

Na primeira etapa, ocorre a conversão do triglicerídeo para diglicerídeo, seguido pela conversão do diglicerídeo para monoglicerídeo, e do monoglicerídeo para glicerol, fornecendo, no balanço final da reação, três moléculas de éster para cada molécula de triglicerídeo (FREEDMAN; BUTTERFIELD; PRYDE, 1986; NOUREDDINI; ZHU, 1997). Um método muito utilizado para monitoramento da reação é a análise cromatográfica que pode ser desenvolvido tanto para identificação de regentes ainda presentes no meio reacional (mono, di e triglicerídeos) quanto para identificação de ésteres (FILLIERES; BENJELLOUN-MLAYAH; DELMAS, 1995).

A reação de transesterificação com álcool pode ser representada pela equação geral ilustrada na Figura 2.4. Para que ocorra a reação é importante monitorar as três etapas consecutivas e a reversibilidade da reação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

Alguns parâmetros que se deve levar em conta em uma reação de transesterificação são: o efeito da razão molar, temperatura e tempo de reação e o tipo de catalisador. Para a realização da transesterificação, é necessário utilizar um excesso de álcool a fim de aumentar a eficiência do processo, excesso esse que pode ser recuperado posteriormente. Nessa etapa se formam duas fases: a glicerina e o biodiesel. Após a separação entre as fases, o biodiesel deve ser purificado antes de sua utilização em motores. A glicerina pode ser recuperada e com isso aumentar a lucratividade do processo, além do que este co-produto apresenta um vasto campo na aplicação das indústrias químicas podendo ser utilizada, por exemplo, na fabricação de medicamentos, cosméticos, aditivos alimentícios e lubrificantes (KNOTHE *et al.*, 2006; FOGLIA; NELSON; MARMER, 1998).

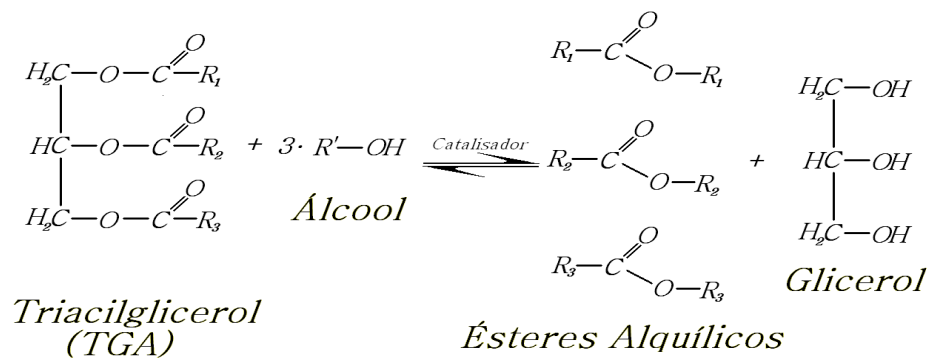


Figura 2.4. Equação geral da transesterificação de triacilglicerol com álcool.

A escolha do catalisador depende do tipo e da qualidade da matéria-prima a ser utilizada (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). Por exemplo, quando se utiliza uma matéria-prima com alto índice de acidez, ou seja, contendo elevados teores de ácidos graxos livres, o catalisador do tipo ácido é o mais eficiente, por não apresentar restrições quanto às propriedades de acidez da matéria-prima, embora necessite de um maior tempo de reação quando comparado ao catalisador alcalino (VICENTE; MARTÍNEZ; ARACIL, 2004). Desta forma, matérias-primas como óleos de frituras residuais, que apresentam elevado grau de oxidação, são mais eficientes quando transesterificadas com catalisadores ácidos. A Figura 2.5 mostra, genericamente, uma reação de transesterificação de um material graxo contendo elevado teor de ácidos graxos livres.

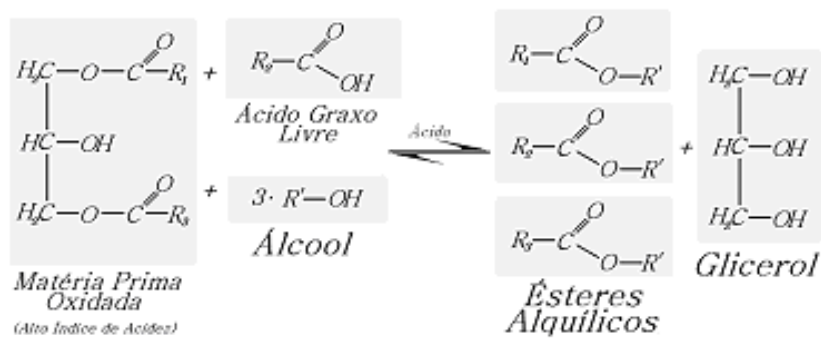


Figura 2.5. Reação de transesterificação de matéria-prima lipídica contendo elevada concentração de ácidos graxos livres via catálise ácida.

No caso da catálise alcalina, é necessário atentar para o teor de ácidos graxos livres presentes na matéria-prima, bem como o teor de água. Esses fatores interferem negativamente no processo, já que consomem o catalisador, formando sabão, aumentam a viscosidade do produto final e dificultam a separação da glicerina (BRADSHAW; MEULY, 1944; FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984; FEUGE; GROSE, 1949). Os catalisadores alcalinos mais utilizados são NaOH, KOH, carbonatos e os alcóxidos como metóxido de sódio e etóxido de sódio (KNOTHE *et al.*, 2006).

Apesar das transesterificações usando catalisadores químicos fornecerem altos níveis de conversões em triglicerídeos em curtos períodos de tempo, esse tipo de catalisador apresenta inúmeros problemas, tais como: necessidade de grande energia térmica para ocorrência da reação, problemas com a recuperação do glicerol, a necessidade de um tratamento posterior ao processo para remoção do catalisador (ácido ou base) do produto, as águas de lavagem necessitam de um tratamento adequado e, por fim, a qualidade da matéria-prima com relação aos teores de ácidos graxos livres e umidade prejudica severamente o rendimento da reação.

2.5. Transesterificação enzimática

O processo de transesterificação enzimática consiste no processo de modificação lipídica catalisada pelas lipases, enzimas obtidas predominantemente de bactérias, leveduras e fungos. O processo, se otimizado, oferece inúmeras vantagens em relação ao processo químico, pois permite maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final devido à seletividade e regioespecificidade das lipases (De CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases são conhecidas por terem a propensão a atuar mais efetivamente em

moléculas de cadeia carbônica longa do que de cadeia carbônica curta (AKOH *et al.*, 2007). Assim, de modo geral, a eficiência da transesterificação dos triglicerídeos com metanol parece ser muito menos favorecida do que com etanol, tanto em sistemas com ou sem solventes orgânicos (MACEDO; MACEDO, 2004; DU; XU; LIU, 2003).

Uma comparação das principais vantagens e desvantagens das vias química e enzimática é apresentada na Tabela 2.1 (ANTCZAK *et al.*, 2009; ROZYCKI *et al.*, 2006). Em particular, deve ser observado que o subproduto glicerol pode ser facilmente recuperado, sem processos complexos, e os ácidos graxos livres nos óleos também são convertidos em seus ésteres correspondentes. Verifica-se, ainda, que a via enzimática substitui os agressivos produtos usados como catalisadores na via química, propicia a reciclagem do catalisador, evita a contaminação do biodiesel facilitando assim o processo de purificação.

Tabela 2.1 - Principais vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático para a produção de biodiesel.

<i>Vias</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Química	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicidade; • Alto rendimento; • Curto tempo de reação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade de separação do catalisador; • Impossibilidade de reutilização do catalisador; • Obtenção de produtos com menor grau de pureza.
Enzimática	<ul style="list-style-type: none"> • Facilidade de separação do catalisador (suporte); • Obtenção de produtos com maior grau de pureza; 	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo de reação; • Custo elevado das enzimas; • Baixo rendimento.

As Figuras 2.6 e 2.7 mostram os fluxogramas dos processos de obtenção de biodiesel por transesterificação química e transesterificação enzimática, respectivamente.

A limitação para a aplicação industrial do processo de transesterificação enzimática é ainda o alto custo das enzimas, tornando a substituição dos catalisadores químicos um grande desafio. Vários trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de contornar esse problema, incluindo a imobilização das lipases em suportes que permitem a reutilização do derivado imobilizado.

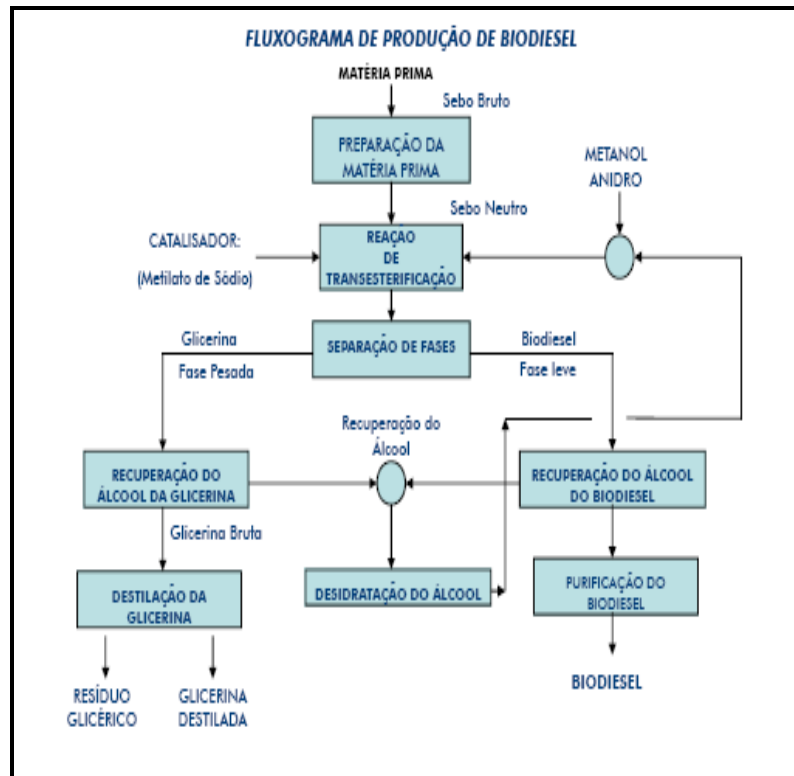


Figura 2.6. Fluxograma do processo de transesterificação química catalisada por álcali.

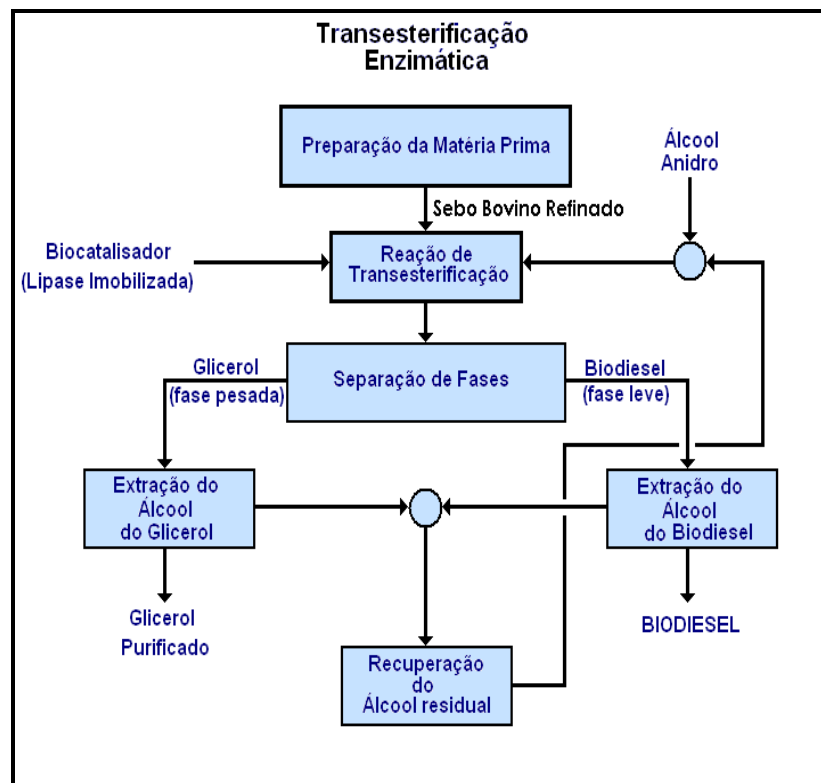


Figura 2.7. Fluxograma do processo de transesterificação enzimática.

2.6. Utilização de lipases imobilizadas como catalisadores

Enzimas imobilizadas são sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizadas em certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser usada repetida e continuamente. A imobilização tem, sob o ponto de vista comercial, como finalidade a utilização da atividade enzimática por um período de tempo maior, operar de forma contínua possibilitando um melhor controle das variáveis do processo, facilitar a separação do biocatalisador do produto de reação, conferir a enzima propriedades catalíticas como maior estabilidade ao pH e temperatura (ZANIN; MORAES, 2004).

Para a escolha do suporte, devem ser consideradas as propriedades físicas e químicas, bem como aquelas relativas à regeneração do material. Os suportes são divididos em suportes orgânicos, inorgânicos e híbridos. Devido à complexidade da natureza enzimática, não existe um suporte ideal e universal para um processo enzimático, portanto, critérios devem ser tomados na escolha do suporte de forma a atender as necessidades de cada situação.

O método de imobilização determinará como a enzima se ligará ao suporte. A enzima pode ser fixada na superfície de um suporte por meio de interações como: adsorção física, ligação iônica, ligação covalente e ligação a um metal (quelação). Portanto, para estabelecer um processo enzimático bem sucedido, é necessário escolher uma enzima com grande afinidade pelo substrato a ser trabalhado, um suporte para imobilização que atenda aos requisitos do reator e do processo escolhido, e, finalmente, e não menos importante, a escolha do método de imobilização para a fixação da enzima ao suporte (ZANIN; MORAES, 2004).

Apesar da existência de inúmeros suportes comerciais, a utilização de lipases imobilizadas em processos tem exigido a elaboração de matrizes específicas para essa finalidade, que resultem em preparados imobilizados com elevadas atividades e características hidrodinâmicas adequadas ao uso em reatores (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; ZANIN; MORAES, 2004; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

As mais recentes tecnologias requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais (PEREIRA; ZANIN; CASTRO, 2003). Materiais híbridos orgânico-inorgânico são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações (GILL; BALLESTEROS, 1998). Independentemente da estratégia utilizada para preparar uma matriz híbrida o processo sol-gel é, indiscutivelmente, o mais empregado (GILL; BALLESTEROS, 1998). O processo sol-gel envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador,

concentração de reagentes, entre outros (REETZ *et al.*, 1998; KEELING-TUCKER *et al.*, 2000). Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto. Além disso, aditivos químicos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/ hidrofóbico (REETZ *et al.*, 1998).

Materiais sol-gel têm sido empregados como suporte para a imobilização de enzimas tanto por encapsulação (REETZ *et al.*, 1998; KEELING-TUCKER *et al.*, 2000) como por ligação covalente (BRUNO *et al.*, 2004; FREITAS, 2006; PAULA *et al.*, 2008).

Recentemente foi testada com sucesso uma matriz híbrida constituída de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) para imobilização de diferentes fontes de lipase: *Mucor miehei* (BRUNO *et al.*, 2004), *Candida antarctica* (FREITAS, 2006), pancreática (PAULA *et al.*, 2007); *Pseudomonas fluorescens* (MOREIRA, 2007; SANTOS *et al.*, 2008); *Candida rugosa* (PAULA *et al.*, 2008) e *Pseudomonas cepacia* (DA RÓS, 2009). Essa matriz combina os atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliicidade e hidrofobicidade, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral (PAULA *et al.*, 2008), bem como elevada atividade e estabilidade. Em função desses resultados promissores, este suporte foi selecionado para imobilizar as preparações de lipase a serem testadas no presente trabalho.

2.7. Processos de obtenção de biodiesel por via enzimática

Trabalhos publicados indicam que a síntese enzimática de biodiesel é dependente de diversas variáveis, incluindo: sistema reacional (tipo de óleo e álcool), origem da preparação enzimática, tipo de suporte de imobilização, razão molar óleo e álcool, temperatura, entre outros fatores (RANGANATHAN; NARASIMHAM; MUTHUKUMAR, 2008).

Verifica-se uma tendência ao uso dos óleos de soja ou palma, de preparações de lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (Lipozyme e/ou Novozym 435) e o metanol como doador do grupo acila. Devido à elevada polaridade desse álcool (ISO *et al.*, 2001) as reações são efetuadas em meio contendo solvente orgânico, com clorofórmio, 1-4-dioxano e benzeno em proporções geralmente elevada da ordem de 50- 90% em relação à massa total de reagentes envolvidos (KRISNANGKURA; SIMAMAHARNNOP, 1992). Para emprego de outros álcoois (etanol, propanol e butanol) não é necessária a adição de solventes orgânicos no meio reacional, o que viabiliza o processo de obtenção de biodiesel com redução de custos

com solvente (normalmente tóxicos, alta inflamabilidade e alto custo) e etapas de destilação, o que reduz o consumo de energia (ISO *et al.*, 2001). Nos trabalhos desenvolvidos no Brasil, preferencialmente tem sido usado etanol como doador do grupo acila, por ser proveniente de biomassa tornando o processo totalmente independente do petróleo.

Mittelbach (1990) estudou a transesterificação do óleo de girassol empregando preparações de lipase imobilizadas disponíveis comercialmente, como *Mucor miehei* (Lipozyme) e *Candida antarctica* (Novozym 435). Foram utilizados como agentes acilantes o metanol, etanol e butanol, na presença (éter de petróleo) ou ausência de solventes. Os rendimentos mais elevados foram obtidos com o etanol e o butanol independente da presença de solvente, porém, o metanol produziu somente traços de produto na ausência de solvente. Em trabalhos similares, essa limitação foi atribuída ao efeito inibitório do metanol sobre a enzima imobilizada, isto é, perda de atividade enzimática causada pela alta concentração de metanol no meio reacional.

Vários estudos comprovaram que para superar este problema e obter elevados rendimentos em ésteres metílicos é recomendado a adição gradativa do metanol ao meio reacional. Shimada *et al.* (1999); Wu *et al.* (1999); Watanabe *et al.* (2000) e Kaieda *et al.* (2000) reportaram conversões entre 80 a 97% realizando a adição de metanol em três bateladas seqüenciais. Adotando essa metodologia, foi também demonstrado que, por simples decantação da mistura de reação, houve separação entre as fases de ésteres metílicos e de glicerol.

O glicerol formado como sub-produto também pode ter efeito negativo sobre a atividade enzimática. Bako *et al.* (2002) sugeriram que esse efeito inibitório pode ser reduzido pela remoção do glicerol do meio reacional por meio de diálise e efetuaram experimentos associando adições seqüenciais de metanol e remoção de glicerol de forma contínua, obtendo rendimentos de 97% a 50°C. Aplicando essa metodologia e utilizando como biocatalisador *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) para transesterificar o óleo de soja, obteve-se um rendimento máximo de 98% a 40°C, sendo reportado a manutenção de um rendimento de 94%, mesmo após quinze ciclos de reação.

Com relação à utilização de sebo bovino como matéria-prima, numa pesquisa detalhada foi verificada que entre 56 trabalhos listados na Web of Science (palavras-chave: biodiesel e sebo bovino), apenas 6 são referentes ao uso de sebo bovino como matéria-prima para a produção de biodiesel. Entre esses, somente dois artigos são diretamente relacionados com a aplicação de tecnologia enzimática (NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996, HSU *et al.*, 2001).

Nelson; Foglia; Marmer, (1996) investigaram a reação de transesterificação de alguns óleos vegetais e sebo bovino, utilizando álcoois primários, secundários e diversas lipases. Os melhores resultados foram obtidos na alcoólise do sebo com metanol ou etanol com a lipase de *Mucor miehei*. Os rendimentos obtidos com etanol hidratado foram superiores ao do anidro. Utilizando-se álcoois secundários, a lipase de *Candida antartica* foi a mais eficiente.

Hsu *et al.*, (2001) demonstraram que a lipase de *Pseudomonas cepacia* foi eficiente na transesterificação de sebo bovino com etanol, alcançando uma conversão da ordem de 95% em 24h. A adição de peneira molecular na proporção de 0,4% em relação ao substrato auxiliou no controle da reação reversa (hidrólise).

O desempenho em motores dos ésteres etílicos e iso-propílicos obtidos a partir de sebo bovino, bem como suas propriedades a baixa temperatura, foram comparáveis aos valores observados para os ésteres metílicos de sebo bovino e de óleo de soja (WU *et al.*, 1998), incentivando, dessa forma, o uso do sebo e do etanol como fontes de matérias-primas para produção de biodiesel.

2.8. Propriedades do biodiesel

As propriedades dos ésteres graxos que constituem o biodiesel determinam as propriedades finais do combustível. Estas propriedades são determinadas pelas características estruturais das moléculas do ácido graxo e do álcool que geram o éster. Algumas das características estruturais que influenciam as propriedades do biocombustível originado a partir de uma molécula de éster são: o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações (KNOTHE, 2005).

A análise destas características são fatores determinantes para a obtenção de um biocombustível de alta qualidade, sendo que as análises químicas e físicas são conduzidas por metodologias variadas, como por exemplo: parâmetros de cor, massa específica à 20 °C, teor de enxofre, resíduo de carbono, índice de cetano, índice de peróxido, entre outras.

O estabelecimento de padrões internacionais para este biocombustível tem sido estudado há algum tempo e tem por objetivo facilitar a comercialização. Alguns padrões foram desenvolvidos na Itália, Áustria e Alemanha. O padrão estabelecido pela Alemanha, DIN V51606 (Deutsches Institut für Normung, 2003), serviu como referência para outros padrões e fixa o índice de iodo em no máximo 115, parâmetro este, discutível por restringir os biocombustíveis oriundos da soja. Nos EUA, a elaboração de um padrão para o biodiesel segue as normas ASTM (American Society for Testing and Materials), para o diesel convencional e a inclusão do índice de iodo tem encontrado obstáculos. Os EUA apresentam

uma significativa produção de soja e o índice de iodo para o óleo extraído desta oleaginosa, bem como os ésteres derivados, fica em torno de 117 – 140 ou 120 – 143 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

No Brasil, por meio da Portaria 255 de 15/09/03, a Agência Nacional do Petróleo ANP estabeleceu as especificações iniciais para o biodiesel puro a ser adicionado no óleo diesel automotivo para testes em frotas cativas ou para uso em processo industrial específico nos termos da Portaria 240 de 25/08/03. Posteriormente, a especificação definitiva para o biodiesel foi publicada na Portaria 42 (KNOTHE *et al.*, 2006).

A especificação brasileira é similar à europeia e americana, com alguma flexibilização para atender às características de matérias-primas nacionais. Alguns itens possuem a informação “anotar”, significando que a ANP não estabeleceu um valor máximo ou mínimo. Nas análises, esses campos devem ser anotados para referência. Existem vários motivos para a ANP se posicionar dessa maneira, em se tratando de viscosidade (a mistura B20 deve atender a viscosidade especificada para diesel) e do índice de iodo (indicador de ligações duplas e, portanto do nível de insaturação do biodiesel). Isto visa não criar obstáculos à utilização de algumas matérias-primas, como a mamona (alta viscosidade) ou a soja e o girassol (alto teor de ácido linoleico, poliinsaturado e, portanto com alto índice de iodo).

O número de cetano é um indicativo adimensional da qualidade de ignição de um combustível diesel. Essa propriedade é similar a octanagem, termo mais conhecido e usado para a gasolina e álcool. Um combustível com alta octanagem tende a ter baixo número de cetano, em outras palavras, a octanagem por definição indica a dificuldade de explosão, enquanto a cetanagem é indicativo de facilidade de explosão. O combustível de referência de alta qualidade para determinar o número de cetano é o hexadecano ($C_{16}H_{34}$), um hidrocarboneto longo de cadeia linear. O número de cetano de um combustível diesel é determinado pelo tempo de retardamento da ignição, isto é, pelo tempo que passa entre a injeção do combustível nos cilindros e a ocorrência da ignição. Valores fora de uma faixa adequada para combustível diesel ocasionam problemas no bom funcionamento do motor. Combustíveis com alto número de cetano, a combustão pode ocorrer antes do combustível e do ar estarem apropriadamente misturados, resultando na emissão de fumaça e uma combustão incompleta. Valores de número de cetano muito baixo podem ocasionar trepidações no motor, falhas no funcionamento, aumento excessivo na temperatura do ar, aquecimento lento do motor na partida fria (1ª partida do dia). Portanto, existe uma faixa para o número de cetano que os fabricantes de motores diesel recomendam que é entre 40 e 50.

A escala de cetano esclarece o porquê dos triacilgliceróis encontrados nos óleos e

gorduras serem adequados para uma alternativa de combustível diesel. As cadeias longas, lineares e não ramificada dos ácidos graxos, similares às existentes em n-alcanos dos combustíveis diesel tradicionais de boa qualidade, remetem a um alto número de cetano.

A viscosidade pode ser definida como uma resistência à vazão, associada à fricção ou atrito interno de uma parte do fluido que escoa sobre a outra afetando, com isso, o funcionamento do motor. Quanto maior a viscosidade, maior a tendência de ocasionar problemas no processo de atomização e conseqüentemente formação de depósitos dentro do motor, e em casos mais severos o entupimento de bicos injetores e graves danos no sistema de injeção. Apesar de ser favorável do ponto de vista energético, o uso de óleos *in natura* como alternativa para combustíveis foi relativamente abandonada principalmente devido ao problema da alta viscosidade dos óleos (SCHWAB; BAGBY; FREEDMAN, 1987). Estudos efetuados em diversos óleos vegetais mostraram que a sua combustão direta conduz à carbonização na cabeça do injetor, resistência à injeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do cárter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas. As causas desses problemas foram atribuídas à polimerização dos triacilgliceróis por meio de suas duplas ligações que conduzem à formação de depósitos, assim como à baixa volatilidade e à elevada viscosidade dos óleos vegetais que geram problemas na atomização do combustível. O processo de transesterificação deve reduzir a viscosidade inicial do óleo ou gordura para valores similares do diesel (KNOTHE *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2003).

Estudos feitos nessa área investigaram a relação que as matérias primas e os álcoois reagentes têm sobre as diversas propriedades do biodiesel. Geralmente, número de cetano, calor de combustão, ponto de fusão e viscosidade aumentam claramente com o aumento da cadeia dos ácidos graxos e decrescem quando aumentam a insaturação (KNOTHE, 2005).

A Tabela 2.2, mostra a concentração de ácidos graxos presentes no sebo bovino, ficando claro a presença da maioria de ácidos graxos saturados, o que confere ao biodiesel derivado desta matéria prima algumas características peculiares. A maior proporção encontrada é de ácido oléico (18:1), essa distribuição afeta diretamente a viscosidade do sebo, bem como suas propriedades físicas e químicas. O biodiesel derivado de sebo bovino apresenta alguns inconvenientes com relação às propriedades à baixa temperatura que podem levar a precipitação e, conseqüentemente, a um baixo desempenho do motor. Entretanto, com relação ao número de cetano e a estabilidade oxidativa, o sebo bovino apresenta superioridade frente aos óleos vegetais devido ao baixo grau de insaturação (KNOTHE *et al.*, 2006).

A Tabela 2.3 apresenta os valores descritos na literatura para o número de cetano, a viscosidade e o calor de combustão em função do tamanho da cadeia dos principais ácidos

graxos e ésteres para biodiesel. A Tabela 2.4 compara as propriedades do diesel de petróleo e do biodiesel de diferentes fontes de matéria prima.

Tabela 2.2 - Ácidos graxos presentes no sebo bovino.

<i>Ácido Graxo</i>	<i>Fórmulas</i>		<i>Massa Molar (g/mol)</i>	<i>(%) Sebo</i>
Mirístico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	14:0	228	1 a 6
Palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	16:0	256	20 a 37
Palmitoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	16:1	254	1 a 9
Heptadecanóico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	17:0	270	1 a 3
Esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	18:0	284	25 a 40
Oléico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	18:1	282	31 a 50
Linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	18:2	280	1 a 5

Fonte: FIRESTONE, 2006.

Tabela 2.3 - Propriedades dos principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras.

<i>Substância</i>	<i>Número de Cetano</i>	<i>Viscosidade (40°C) (cP)</i>	<i>Calor de Combustão^{c, d} (kg cal/mol)</i>
Ácido Caprílico	-	-	-
Metil Éster	33,6	0,99 ^a	1313
Etil Éster	-	1,37 ^a (25°C)	1465
Ácido Cáprico	47,7	-	1453,07 (25°C)
Metil Éster	47,2 ^a	1,40 ^a	1625
Etil Éster	51,2 ^a	1,99 ^a (25°C)	1780
Ácido Láurico	-	-	1763,25 (25°C)
Metil Éster	61,4 ^a	1,95 ^b	1940
Etil Éster	-	2,88 ^b	2098
Ácido Mirístico	-	-	2073,91 (25°C)
Metil Éster	66,2 ^a	2,69 ^a	2254
Etil Éster	66,9 ^a	-	2406
Ácido Palmítico	-	-	2384,76 (25°C)
Metil Éster	74,5 ^a	3,60 ^b	2550
Etil Éster	85,9 ^b	-	2717
Ácido Esteárico	61,7 ^a	-	2696,12 (25°C)
Metil Éster	86,9 ^a	4,74 ^a	2859
Etil Éster	76,8 ^b	-	3012
Ácido Oléico	46,1 ^b	-	2657,4 (25°C)
Metil Éster	55 ^a	3,73 ^a	2828
Etil Éster	53,9 ^a	5,50 ^a (25°C)	-

Fontes: ^a –KLOPFENSTEIN, 1985

^b –KNOTHE; MATHEAUS; RYAN III, 2003

^c –FREEDMAN; BAGBY, 1989-a

^d – WEAST, 1986

Tabela 2.4 - Dados comparativos entre as propriedades do biodiesel metílico obtido de diferentes matérias-primas e o diesel mineral.

<i>Matéria-prima</i>	<i>Viscosidade Cinemática (mm²/s)</i>	<i>Número de Cetano</i>	<i>Poder calorífico inferior (MJ/l)</i>	<i>Ponto de Névoa (°C)</i>	<i>Ponto de Fulgor (°C)</i>	<i>Densidade (g/L)</i>	<i>Enxofre (% m/m)</i>	<i>Referência</i>
Amendoim	4,9 (37,8°C)	54	33,6	5	176	0,883	-	SRIVASTA; PRASAD, 2000
Soja	4,5 (37,8°C)	45	33,5	1	178	0,885	-	
Babaçu	3,6 (37,8°C)	63	31,8	4	127	0,879	-	
Palma	5,7 (37,8°C)	62	33,5	13	164	0,880	-	
Girassol	4,6 (37,8°C)	49	33,5	1	183	0,860	-	
Sebo bovino	4,99 (40°C)	61,8	-	15,6	187,8	-	-	YAHYA; MARLEY, 1994
Milho (Residual)	6,23 (30°C)	63,9	42,3	-	166	0,884	0,0013	YAMANE; UETA;
Colza (Residual)	9,48 (30°C)	53	36,7	-	192	0,895	0,002	SHIMAMOTO, 2001
Colza	4,2 (40°C)	51-59,7	32,8	-	-	0,882	-	VARESE; VARESE, 1996
Diesel	1,2-3,5 (40°C)	51	35,5	-	-	0,83-0,84	-	

2.9. Métodos analíticos para quantificação da qualidade do biodiesel

Para a obtenção de um biocombustível de alta qualidade, algumas características técnicas são imprescindíveis tais como: a reação de transesterificação deve ser completa, refletindo a ausência total de ácidos graxos remanescentes, e o biodiesel produzido deve ser de alta pureza, não contendo traços de glicerina residual ou álcool excedente de reação (KNOTHE *et al.*, 2006).

A estabilidade à oxidação do biodiesel é um outro parâmetro importante para determinar por quanto tempo as características do produto final serão preservadas, sob condições de armazenagem, calor, umidade, presença de traços de metais e a natureza do tanque de armazenamento. As razões para auto-oxidação do biodiesel estão relacionadas à presença de ligações duplas nas cadeias dos ésteres. Essas reações de oxidação ocorrem em diferentes velocidades, dependendo do número e da posição das duplas ligações (FREEDMAN; BAGBY, 1989-b). Estudos comprovaram que altas temperaturas, presença de metais, luz e ar facilitam o processo de oxidação, sendo a estrutura do ácido graxo o fator mais influente sobre a propriedade oxidativa do biodiesel.

Para melhorar a estabilidade oxidativa do biodiesel, TANG *et al.* (2008) investigaram a influência de antioxidantes como o alfa-tocoferol, o butirato de hidroxianisole (BHA), o butirato de hidroxitolueno (BHT) e verificaram que a ação do antioxidante aumenta juntamente com a sua concentração e que o local reservado para armazenagem do biodiesel é de crucial importância na manutenção das suas propriedades combustíveis por um maior período de tempo.

Para a análise dessa propriedade existem vários métodos que remetem à qualidade do material. O índice de acidez apresenta uma boa alternativa para o acompanhamento da qualidade do combustível durante a armazenagem. Este índice revela o grau de oxidação do material e é expresso em miligramas de hidróxido de potássio para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em um grama de amostra. O índice de peróxido e o índice de iodo também estão relacionados com a estabilidade oxidativa do biodiesel, porém, o índice de peróxido é o método menos aconselhável para acompanhar a estabilidade à oxidação por apresentar um comportamento inicial crescente e depois decrescente devido à formação de produtos secundários de oxidação. O índice de Iodo é uma medida indicativa do teor de insaturação do material graxo.

Outra técnica que apresenta grande potencial para a determinação da estabilidade térmica e oxidativa do biodiesel é a Análise Térmica, termo que abrange um grupo de técnicas

nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou da temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (HASSEL, 1976).

As técnicas de análise térmica mais empregadas compreendem a análise termogravimétrica (TG ou TGA), análise térmica diferencial (DTA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termo-mecânica (TMA), análise dilatométrica (DIL), análise dínamo-mecânica (DMA) e análise do flash de luz ou laser (LFA).

TG é uma técnica na qual a massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. DTA é uma outra técnica que consiste em medir a diferença de temperatura (ΔT), entre a substância e o material de referência, enquanto ambos estão sujeitos a um programa controlado de temperatura. A análise de DSC é uma técnica que relaciona a diferença entre a energia fornecida à substância e a de um material de referência, em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura (DANTAS *et al.*, 2007-a; DUNN, 2006). DIL é a técnica na qual a mudança nas dimensões de uma amostra é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada. DMA é um método termo-analítico desenvolvido para caracterização do comportamento mecânico de um material quando este é submetido a forças dinâmicas (frequência e carga oscilante) a um programa controlado de temperatura. E finalmente o LFA, que é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização da difusividade térmica de um material que é aquecido por um pequeno pulso de laser ou luz de alta intensidade energética (WENDHAUSEN; RODRIGUES; MARCHETTO, 2009).

Os métodos termoanalíticos são vantajosos, em relação aos métodos convencionais, pois apresentam uma maior precisão e sensibilidade, empregam uma menor quantidade de amostra e apresentam uma maior variedade de resultados em um único gráfico (LIMA *et al.*, 2007; DANTAS *et al.*, 2007-a; DANTAS *et al.*, 2007-b).

Na Tabela 2.5 são listados alguns trabalhos que utilizaram as técnicas termoanalíticas para determinação da estabilidade térmica e oxidativa de amostras de biodiesel obtidas de diversas fontes de matéria-prima pelas rota metílica ou etílica.

Tabela 2.5 - Aplicação de técnicas termoanalíticas para determinação de propriedades dos combustíveis.

<i>Matéria Prima</i>	<i>Álcool</i>	<i>Catalisador</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Referência</i>
Óleo de soja virgem e residual	Etanol	NaOH	Comparação da estabilidade oxidativa de ésteres etílicos de ácidos graxos de soja, utilizando Racimat e técnicas termoanalíticas	FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005
Óleo de babaçu	Metanol	KOH	Avaliação da termogravimetria e calorimetria do biodiesel de babaçu obtido por rota metílica	SANTOS <i>et al.</i> , 2007.
Óleo de Soja	Metanol	KOH	Comportamento térmico e reológico do diesel e misturas com biodiesel de metanol	CANDEIA <i>et al.</i> , 2007
Óleo de milho	Metanol / Etanol	Não especificado	Estudo térmico (TG e TGA) e cinético do biodiesel de milho obtido por rotas etílicas e metílicas visando determinar os parâmetros cinéticos da decomposição do biodiesel	DANTAS <i>et al.</i> , 2007-a
Óleo de rícino	Metanol / Etanol	KOH	Cálculo dinâmico da cinética da decomposição térmico do biodiesel de óleo de rícino por TG variando a taxa de aquecimento para o cálculo dos parâmetros cinéticos	CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2007
Óleo de milho	Metanol / Etanol	Não especificado	Caracterização e compensação dos efeitos cinéticos do biodiesel de milho	DANTAS <i>et al.</i> , 2007-b
Óleo de babaçu	Etanol	NaOH	Caracterização do biodiesel de babaçu etílico empregando TG para determinar ponto de ebulição e pressão de vapor.	LIMA <i>et al.</i> , 2007

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Enzimas

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas 5 preparações de lipases comerciais de diferentes fontes e fornecedores, incluindo as lipases de *Pseudomonas cepacia* (Lipase PS) e *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK) manufaturadas pela Amano Pharmaceuticals (Japão), *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase) gentilmente cedida pela Novozymes (Paraná), *Rhizopus oryzae* (Piccantase R8000®) manufaturada pela DSM Food Specialties (Delft, Holanda) e lipase de pâncreas de porco (Tipo II) adquirida da Sigma Co (St. Louis, MO, EUA).

3.2. Suporte de imobilização

Como suporte de imobilização das lipases testadas foi utilizada uma matriz híbrida preparada pela técnica sol-gel (PAULA *et al.*, 2008), empregando como precursor Tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, EUA).

3.3. Matérias-primas

Como materiais de partida para a síntese de biodiesel foram utilizados: etanol anidro (98%, Vetec) e amostra de sebo bovino refinado fornecida pela FERTIBOM (Catanduva-SP, Brasil), tendo a seguinte composição em ácidos graxos (w/v): 3% mirístico, 25% palmítico, 32% esteárico e 40% oléico, com massa molecular média de 856.76 g. mol⁻¹.

3.4. Amostra de biodiesel

A amostra de biodiesel etílico de sebo bovino (BIOMAX) foi gentilmente doada pela FERTIBOM Indústrias LTDA (Catanduva-SP), lote processado em 30/05/2007 sem adição de conservantes.

3.5. Outros materiais e reagentes

Os outros reagentes utilizados foram: Epícloridrina, Hexano p.a. (Reagen Chemical Co, São Paulo, Brasil); Acetona p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha); Etanol comercial; Ácido Láurico (Cromoline Química Fina Ltda, Diadema/SP, Brasil), peneira molecular 0,32cm de diâmetro (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD adquirida da Sigma-Aldrich

Chemical; Goma arábica em pó, pura e Polietilenoglicol – PEG-1.500 ambos da marca Synth (adquirido da Hipperquímica, Santo André - SP, Brasil). Azeite de oliva comercial (baixa acidez, grau comercial). Indicador ácido-base (fenolftaleína – Coleman). Álcool polivinílico (MM=72.000 Reagen), HCl (mínimo 36%, Isofar) e Tetraetilortossilicato (Sigma-Aldrich). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

3.5. Equipamentos

A Tabela 3.1 apresenta os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 3.1 - Equipamentos utilizados.

<i>Tipo de análise e/ou Ensaio</i>	<i>Equipamento</i>	<i>Modelo/ fabricante</i>
Medidas de pH	Potenciômetro	Modelo TEC2, Tecnal (TECNAL, Piracicaba/SP, Brasil)
Atividade hidrolítica	Bureta Digital	Modelo Bürette, Hirschmann Techcolor (Hirschmann Techcolor)
Dosagem de proteínas	Espectofotômetro UV-Visível	Modelo Cary 50 Conc., Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA)
Teor de umidade	Balança analítica	ID 50, Marte (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa Rita do Sapucaí / MG, Brasil)
Dosagem de monoésteres	Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800, Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA)
Agitação	Agitador mecânico	Modelo RW20-Digital, IKA, (IKA Laboratory Equipment, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil)

3.6. Procedimento experimental

3.6.1. Síntese e ativação do suporte híbrido POS-PVA

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi sintetizado, conforme metodologia descrita por Paula *et al.* (2008), pela mistura de 5mL de tetraetilortossilicato (TEOS), 5mL de etanol e 6mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (m/v). Essa mistura foi aquecida a 60° C, sob agitação, com adição de duas a três gotas de HCl concentrado. Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi mantida a 25°C por 48 h até a completa evaporação do álcool e polimerização para formação do suporte híbrido. O composto foi então triturado até que passasse completamente por uma peneira padrão série

Tyler (adquirido da Hipperquímica, Santo André/SP, Brasil) de 42 MESH e ficasse retido em peneira de 60 MESH. As principais propriedades morfológicas do suporte obtido são apresentadas na Tabela 3.2, e informações complementares do suporte são descritas em Santos *et al.*, 2008. Em seguida, o suporte foi ativado com solução de epicloridrina 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7,5), na proporção massa de suporte: volume de solução de 1:10, sendo esta mistura mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão de fosfato, e em seguida levado à estufa (60 °C) por 24 h.

Tabela 3.2 – Propriedades morfológicas do suporte POS-PVA quanto à área superficial, volume de poros e tamanho médio dos poros.

<i>Área superficial específica</i> (m ² /g)	<i>Volume de poros</i> (cm ³ /g)	<i>Tamanho médio dos poros</i> (Å)
461,00	0,275	22,91

(SANTOS *et al.*, 2008).

3.6.2. Imobilização de lipases de diferentes fontes no suporte híbrido

O suporte ativado foi embebido em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, o sólido foi decantado e o excesso de hexano foi removido. Ao suporte foi então adicionado PEG 1500 e lipase na proporção de 250 mg de enzima: 1g suporte: 100 µL de PEG. A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo, com posterior lavagem com uma solução de hexano e acetona (1:1). A atividade hidrolítica do derivado imobilizado foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES *et al.*, 1999). O rendimento de imobilização ($\eta\%$) foi calculado pela Equação 3.1.

$$\eta (\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad \text{Equação 3.1}$$

em que: U_0 = unidades de atividade oferecidas para imobilização; U_s = unidades de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa seca).

3.6.3. Testes de triagem da lipase mais efetiva para efetuar a síntese de biodiesel

As reações de síntese do biodiesel foram realizadas em reatores de vidro cilíndrico (6 cm de altura e 4 cm de diâmetro interno) encamisados com capacidade de 50 mL de volume (Figura 3.1). Para o controle de temperatura das reações foi utilizado um banho termostatizado

Modelo 145, Marconi (MARCONI, Piracicaba/SP, Brasil). Os meios reacionais continham misturas de sebo bovino e etanol numa razão molar fixa gordura/etanol de 1:9 e foram incubados com diferentes preparações de lipase imobilizada em POS-PVA numa proporção fixa de 400 Unidades de atividade por grama de sebo. Todos os experimentos foram realizados com 30 gramas de meio reacional numa temperatura de 45°C, sob agitação magnética constante por um período máximo de 48 h. As reações foram monitoradas pela retirada de alíquotas do meio reacional para dosagem dos ésteres etílicos formados por cromatografia de fase gasosa, empregando metodologia estabelecida por Urioste *et al.* (2008).



Figura 3.1. Reator de vidro utilizado para síntese de biodiesel nos testes de triagem da fonte de lipase.

3.6.4.Otimização da reação de transesterificação enzimática de sebo bovino e etanol planejamento experimental

A otimização das condições reacionais da reação de transesterificação do sebo bovino foi efetuada por meio de planejamento experimental, considerando como variáveis independentes: temperatura e razão molar (sebo/etanol). As sínteses foram realizadas em reator de vidro cilíndrico de capacidade de 50 mL, acoplado com condensador de refluxo (Figura 3.1) contendo sebo bovino e etanol na razão molar adequada, para o experimento correspondente. A Tabela 3.3 mostra os níveis selecionados para o planejamento experimento proposto.

Tabela 3.3 - Níveis reais e codificados para as variáveis temperatura e razão molar, avaliados segundo planejamento experimental estrela rotacional.

<i>Variáveis</i>		<i>Níveis</i>				
Reais	Codificadas	-α	-1	0	1	+α
Temperatura	X ₁	46	48	53	58	60
Razão Molar (etanol/sebo)	X ₂	6	7	9,5	12	13

As reações foram realizadas com a lipase PS (*Pseudomonas cepacia*) imobilizada em POS-PVA numa proporção fixa de 400 Unidades de atividade por grama de meio reacional. Todos os experimentos foram realizados com 30 gramas de meio reacional, sob agitação magnética constante por um período máximo de 48 h. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, para quantificação da formação dos ésteres de etila por cromatografia de fase gasosa, empregando metodologia estabelecida por Urioste *et al.* (2008). Os resultados obtidos foram analisados com auxílio dos softwares Statistica versão 5.0 (StatSoft Inc., USA) e Design Expert 6.0 (Stat Ease Corporation, USA).

3.6.5. Comprovação do modelo estatístico

As condições otimizadas previstas no delineamento experimental foram utilizadas para efetuar um experimento de comprovação do modelo estatístico gerado. Para realização deste ensaio foi utilizado um reator de vidro cilíndrico encamisado com 400mL de capacidade (8cm de altura e 8cm de diâmetro), equipado com sistema de agitação mecânica e condensador de refluxo, como ilustrado na Figura 3.2. O reator possuía a mesma configuração dos reatores utilizados nos ensaios propostos no delineamento fatorial, como anteriormente mostrado na Figura 3.1 (item 3.6.4).

Neste ensaio empregou-se 110g de meio reacional na razão molar de 1:7 (gordura: etanol). O carregamento enzimático foi mantido em 400 Unidades de atividade hidrolítica por grama de meio reacional e a reação foi conduzida a 48°C por um período máximo de 18h. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, para quantificação da formação dos ésteres de etila por cromatografia de fase gasosa, empregando metodologia estabelecida por Urioste *et al.* (2008).

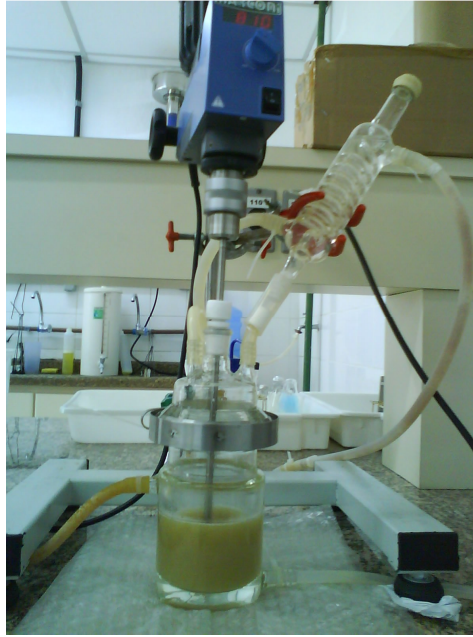


Figura 3.2. Reator com agitação mecânica e condensador de refluxo.

3.6.6. Separação dos ésteres (recuperação do glicerol)

Para a separação da glicerina liberada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída de uma lavagem com água destilada. O volume da amostra recolhido foi medido e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação (Figura 3.3), efetuando-se uma agitação e deixando a mistura em repouso por 30 min para a separação das fases. A fase superior era composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à evaporação em rota-evaporador.

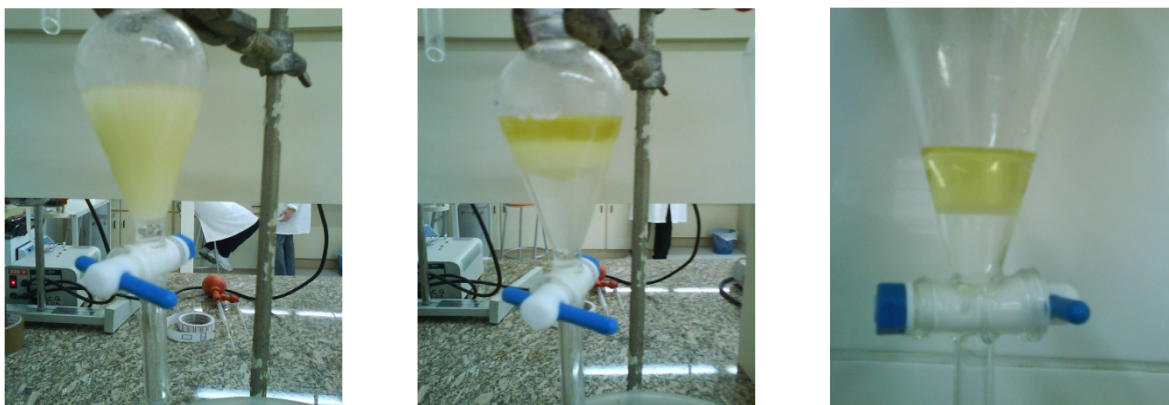


Figura 3.3. Processo de decantação do biodiesel.

3.7. Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas do derivado imobilizado selecionado

3.7.1. Propriedades bioquímicas

A influência do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase PS livre e do derivado imobilizado foram avaliadas em experimentos realizados segundo um planejamento experimental 2^2 estrela rotacional com quatro replicatas no ponto central. Como variáveis resposta foram consideradas as atividades hidrolíticas da lipase livre e imobilizada. Os níveis reais e codificados das variáveis em estudo estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Níveis reais e codificados para as variáveis pH e temperatura avaliados segundo planejamento experimental estrela rotacional.

Variáveis		Níveis				
Reais	Codificadas	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
pH	X ₁	6,1	6,5	7,5	8,5	8,9
Temperatura	X ₂	36	40	50	60	64

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato (preparado pela emulsão de azeite de oliva com solução de goma arábica a 7%), 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0, 1 M, com pH variável, 6,1, 6,5, 7,5, 8,5, 8,9) e preparação enzimática (0,5mg/mL), para enzima livre ou 0,05g do derivado imobilizado. Os frascos foram incubados em temperaturas variadas (36, 40, 50, 60 e 64 °C) por 5 min, em banho termostaticado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1) e os ácidos graxos formados titulados com solução de KOH 0,02 M (SOARES *et al.*, 1999). Os resultados obtidos foram analisados com auxílio dos softwares Statistica versão 5.0 (StatSoft Inc., USA) e Design-Expert 6.0 (Stat-Ease Corporation, USA).

3.7.2. Parâmetros cinéticos da lipase livre e imobilizada

Para o cálculo da constante de Michaelis-Menten foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variáveis obtidos a partir de emulsões preparadas em diferentes proporções de azeite de oliva (10-70%) e solução aquosa de goma arábica (7% m/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise, catalisada pelas preparações de lipase livre e imobilizada, foram determinadas de acordo com a metodologia de hidrólise do azeite de oliva (SOARES *et al.*, 1999). As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas pelo Programa Enzyme fitter.

3.7.3. Estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada

A estabilidade térmica das preparações de lipase foi determinada por meio da incubação de amostras da lipase livre (1 mL, 5 mg/mL) e imobilizada (0,05 g) numa temperatura de 60 °C em meio aquoso (0,1 M tampão fosfato, pH 6,5) durante diferentes períodos de incubação. Para a lipase livre retiram-se amostras nos tempos de 5, 10, 15, 30 e 60 min, e para a lipase imobilizada retiram-se amostras nos intervalos de 30, 60 e 120 min. Após tratamento térmico, as amostras de lipase (livre e imobilizada) foram imediatamente resfriadas e a atividade residual determinada a 40 °C, pelo método da hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares *et al.* (1999). As constantes de desativação (kd), foram calculadas pela Equação 3.2.

$$\ln A = \ln A_0 - Kd \times t \quad \text{Equação. 3.2}$$

em que: A_0 = atividade enzimática inicial; A = atividade residual após tratamento térmico durante um certo período de incubação (t).

Os tempos de meia-vida para a enzima livre e imobilizada foram calculados pela Equação 3.3.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K_d} \quad \text{Equação. 3.3}$$

3.8. Métodos de análises

3.8.1. Características da matéria-prima (sebo bovino)

3.8.1.1. Índice de Acidez (I.A.)

O índice de acidez da matéria-prima foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação em um Erlenmeyer pesaram-se cerca de 2,0 g da amostra, seguida da adição de 25mL de uma mistura de éter etílico e álcool etílico (95%) preparada na proporção 2:1 em volume. Em seguida, titulou-se com solução de hidróxido de potássio (KOH) de concentração 0,01M previamente padronizada, utilizando-se fenolftaleína como indicador. O resultado foi calculado pela relação entre a massa em miligramas de hidróxido de potássio consumidos por grama de amostra analisada, conforme as Equações 3.4 (a, b).

$$I.A. = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times MM_{base} \times C_{base}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.4 (a)}$$

$$\%AGL = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times MM_{ácido\ graxo} \times C_{base} \times 100}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.4 (b)}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL), MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol), C_{base} = Concentração molar da solução de KOH (mol/L), $MM_{ácido\ graxo}$ = Massa Molar do ácido oléico (282 g/mol), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g).

3.8.1.2. Índice de Peróxido (I.P.)

O índice de peróxido da matéria-prima foi determinado de acordo com o método oficial Cd 8b-90 da AOCS (2004). Para esta determinação, uma massa de aproximadamente 5g de amostra foi submetida à reação com solução saturada de iodeto de potássio por 1 min. O excesso de iodeto de potássio foi então titulado com tiosulfato de sódio 0,01N. O resultado foi calculado pela relação entre a quantidade em miliequivalentes de peróxido por 1000g de amostra. O cálculo do índice de peróxido foi realizado de acordo com a Equação 3.5:

$$I.P. = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times C_{Tiosulfato} \times 1000}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.5}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL), $C_{tiosulfato}$ = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g)

3.8.1.3. Índice de Saponificação (I.S.)

O índice de saponificação da matéria-prima foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta medida, uma amostra de 2,5 g da amostra foi saponificada com solução alcoólica de hidróxido de potássio (4% m/v) e titulada com ácido clorídrico (0,5 N). O cálculo do índice de saponificação foi realizado de acordo com a Equação 3.6.

$$I.S. = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{KOH} \times C_{HCl}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.6}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL), MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol), C_{HCl} = Concentração molar da solução de HCl (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g)

3.8.1.4. Índice de Iodo (I.I.)

O índice de iodo da matéria-prima foi determinado pelo Método de Hübl de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação, uma amostra (cerca de 0,25g) foi submetida à reação com solução de iodo por 30 min ao abrigo da luz e posteriormente titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1N. O branco foi realizado com 10 mL de clorofórmio e 20 mL de solução alcoólica de iodo 5%. O cálculo do índice de iodo foi realizado pela Equação 3.7:

$$I.I. = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{I_2} \times C_{Tiosulfato} \times 0,1}{2 \times m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.7}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL), MM_{I_2} = Massa Molar do I_2 (253,8g/mol), C_{tio} = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g)

3.8.2. Determinação das propriedades da lipase livre e imobilizada

3.8.2.1. Teor de proteína

O conteúdo de proteína nas preparações de lipase livre foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o reagente brilhante de Comassie Blue e Albumina bovina cristalina (ABS) como padrão. Para a determinação da absorbância foi utilizado um espectrofotômetro UV-Visível (modelo Cary 50 Conc., Varian- Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA).

3.8.2.2. Atividade hidrolítica da lipase e derivados imobilizados

A atividade enzimática da lipase nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares *et al.* (1999). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH (0,02M) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a Equação 3.8 e expressas em µmol/g.min (U).

$$\text{Atividade hidrolítica} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g} \cdot \text{min}} \right) = \frac{(V_A - V_B) \cdot M \cdot 10^6}{t \cdot m} \quad \text{Equação 3.8}$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra, V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco, M = molaridade da solução de KOH, t = tempo de reação em min, m = massa em gramas.

3.8.2.3. Atividade sintética dos derivados imobilizados

A atividade sintética das preparações de lipase imobilizada foi quantificada pelo consumo do ácido láurico na reação de esterificação do laurato de glicerila empregando substrato numa razão molar ácido-álcool de 3:1 a 60°C e incubando com concentração enzimática de 5% (m/m), em relação à massa de reagentes de partida, mantida sob agitação por 40 min (LANGONE; SANTANA, 1999). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto com capacidade de 20 mL provido de agitação mecânica e conectado a um banho termostatizado. Alíquotas de 200 µL, em duplicata, foram retiradas do meio reacional nos tempos inicial e após 40 min de reação e diluídas em 10 mL de solução de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e de extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido carboxílico consumido foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,02 M. Uma unidade de atividade foi definida pela concentração de enzima necessária para esterificar 1µmol de ácido por minuto, nas condições experimentais adotadas. A atividade sintética foi calculada pela Equação 3.9.

$$\text{Atividade sintética (U lg de biocatalisador)} = \frac{(V_0 - V_{40}) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad \text{Equação 3.9}$$

Em que: M é concentração molar da solução de NaOH (0,02 M); V_0 é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL); V_{40} é o volume de NaOH gasto na titulação

da amostra após 40 min de reação (mL); m_e é a massa de preparação enzimática utilizada na reação (g); t é o tempo de reação (min).

3.8.3. Análises do biodiesel

3.8.3.1. Determinação dos ésteres formados na reação de etanolise da gordura animal

As concentrações dos ésteres formados na reação de etanolise do sebo bovino foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se um cromatógrafo Modelo GC-3800, Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA) uma coluna empacotada (5%DEGS CHR-WHP 80/100 6ft 2.0mmID 1/8inOD, RESTEK), operando nas condições definidas nas Tabela 3.5, conforme estabelecido por Urioste *et al.* (2008). As amostras foram previamente diluídas com hexano numa proporção de 1:3.

Tabela 3.5 - Condições para determinação dos ésteres de etila.

<i>Padrão interno</i>	<i>Hexanol (0,0275 g/g)</i>	
Programa de temperaturas	120 °C por 10 min e 170 °C por 18 min	
Rampa de Aquecimento	25 °C/ min	
Gás de arraste	Nitrogênio	
Atenuação do cromatógrafo	A, B e C = 16	
Preparação da amostra	0,1 g da amostra em 0,3 g de hexano	
Preparação para injeção	1:1 (amostra : padrão interno)	
	Padrão Interno (P.I.)	1,17min
	C8 EtOH	4,13 min
	C10 EtOH	8,26 min
	C12 EtOH	10,77 min
	C14 EtOH	12,31 min
	C16 EtOH	15,04 min
	C18 EtOH	20,96 min
	C18:1 EtOH	23,57 min
	C18:2 EtOH	26,83 min

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação à massa teórica esperada de ésteres de etila (M_e). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial da gordura de sebo (M_0), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela Equação 3.10 (a), em que M_0 corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) Equação 3.10 (b). O rendimento foi calculado utilizando a massa

total de ésteres obtida pela análise por cromatografia gasosa (Mt) pela massa teórica de ésteres de etila (Me), conforme mostrado na Equação 3.10 (c).

$$Me = \frac{(Mo.MMe)}{MMa} \quad (a) \quad Mo = Ca.Mi \quad (b) \quad R = \frac{Mt}{Me} \times 100 \quad (c) \quad \text{Equação 3.10}$$

3.8.3.2. Análise de viscosidade do sebo bovino e do biodiesel

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 50 °C para o sebo bovino e a 40°C para o biodiesel, empregando 1 mL de amostra. As análises do produto transesterificado foram efetuadas após a etapa de purificação, conforme descrito no item 3.6.4. Os dados obtidos (viscosidade, taxa de deformação e tensão de cisalhamento) foram ajustados de acordo com a lei de potência (Equação 3.11), conforme descrito por Freitas *et al.* (1998).

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad \text{Equação 3.11}$$

Em que: τ é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de deformação aplicada, n é o valor do coeficiente angular e K é o índice de consistência.

3.8.3.3 Análise Termogravimétrica

Um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA 50 foi utilizado para efetuar as análises de termogravimetria das amostras de sebo bovino e dos produtos transesterificados obtidos com rendimentos de reação superiores a 90%, adotando as seguintes condições de análise: fluxo de 50mL/ min de nitrogênio, taxa de aquecimento de 10 °C/min na faixa de aquecimento de 25 a 1000°C.

3.8.3.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Amostras de sebo bovino, biodiesel, lipase livre e do derivado imobilizado foram submetidas à análise de espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), conduzida na faixa de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , para o acompanhamento da

reação de transesterificação e do procedimento de imobilização. O Espectrômetro utilizado foi modelo Spectrum GX, Perkin Elmer.

3.8.3.5 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica baseada nas transições entre níveis de energia de um núcleo, quando colocado em um campo magnético externo. É uma técnica de espectroscopia bastante difundida e muito utilizada para elucidação de moléculas orgânicas. Quando a amostra é colocada em um campo magnético pode sofrer absorção da radiação eletromagnética na região de radio frequência em função de determinados núcleos dessa molécula. Os núcleos, por sua vez, possuem cargas que podem girar em torno do seu próprio eixo nuclear gerando um dipolo magnético. As análises de ressonância magnética nuclear protônica (RMN 1H) das amostras do sebo bovino e biodiesel foram realizadas em um espectrofotômetro Varian modelo Mercury 300MHz. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) utilizando-se como referência o tetrametilsilano.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho, incluindo composição da matéria prima (sebo bovino refinado), testes de seleção do derivado imobilizado mais efetivo para conduzir a reação de transesterificação do sebo bovino com etanol e otimização da reação de síntese de biodiesel empregando o catalisador mais eficiente. O derivado imobilizado selecionado foi caracterizado com relação as suas propriedades bioquímicas, cinéticas e estabilidade térmica. O biodiesel obtido nas condições otimizadas foi caracterizado com relação as propriedades de interesse do projeto, aplicando técnicas de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho, Espectroscopia de Ressonância Nuclear de Próton e Termogravimetria (TG).

4.1. Caracterização da matéria-prima

As características da amostra de sebo bovino quantificadas por técnicas descritas em 3.8 estão listadas na Tabela 4.1 juntamente com os limites desejáveis para utilização desta matéria- prima para síntese de biodiesel.

Tabela 4.1 - Propriedades do sebo bovino refinado.

<i>Características</i>	<i>Amostra de sebo bovino</i>	<i>Limites (Máx.)</i>
Índice de Acidez (mg KOH/g)	1,96	10
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	197,03	190-200
Índice de Iodo (g I ₂ / 100g)	33,49	33-47
Índice de Peróxido (meq/ 1000g)	2,54	10
Ácidos Graxos Livres (%)	0,95	1

Fonte: FIRESTONE, 2006.

Os índices de acidez e de peróxido indicam a deterioração da gordura em termos de rancidez hidrolítica, a partir da concentração de ácidos graxos livres na gordura (pelo índice de acidez) e rancidez oxidativa (pelo índice de peróxido). O índice de saponificação identifica a presença de óleos e gorduras que contenham uma grande porção de ácidos graxos de baixa massa molecular, assim, quanto menor a massa molecular do ácido graxo, maior será o índice de saponificação. O índice de iodo revela o grau de insaturação de matéria-prima.

Os valores listados na Tabela 4.1 indicam que a amostra de sebo bovino empregada no desenvolvimento desse projeto atende o grau de pureza exigido para ser utilizada na reação de transesterificação e são similares aos descritos por Filho (2007).

4.2. Imobilização de lipases de diferentes fontes no suporte híbrido POS-PVA

Foram utilizadas cinco preparações de lipases comercializadas por diferentes fornecedores. A caracterização dessas preparações foi uma etapa preliminar necessária, tendo em vista que os valores de atividade fornecidos pelos fabricantes são determinados na maioria dos casos por métodos diversos. Desta forma, na Tabela 4.2 são apresentadas as atividades hidrolíticas dessas preparações empregando a hidrólise do azeite de oliva como método de análise (pH 7,0 e 37°C), conforme procedimento descrito na seção 3.8. A Tabela 4.2, também inclui os teores de proteína e as atividades específicas dessas preparações.

Tabela 4.2 - Atividade hidrolítica, teor de proteínas e atividade específica das lipases testadas.

<i>Fonte da lipase</i>	<i>Nome Comercial</i>	<i>Atividade hidrolítica (U/g)</i>	<i>Proteína (mg/g)</i>	<i>Atividade específica (U/mg de proteína)</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase PS	39760	13	3156
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipase AK	19820	14	1416
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Lipolase	57894	15	3886
<i>Rhizopus oryzae</i>	Piccantase R8000 [®]	19874	134	149
Lipase de pâncreas de porco	Lipase pancreática	6484	122	53

* valores em matéria seca.

As atividades específicas das lipases testadas apresentaram uma ampla faixa de variação entre 53 a 3886 U/mg de proteína, indicando diferentes graus de pureza. A preparação Lipolase foi que apresentou a atividade específica mais elevada (cerca de 3900U/mg de proteína), enquanto a lipase de pâncreas de porco foi que apresentou o menor grau de pureza. Entretanto, para aplicação em biocatálise preparações enzimáticas comerciais com baixo teor de pureza são geralmente usadas, devido seu baixo custo e elevada estabilidade, tendo em vista essas preparações contem agentes como açúcares ou outras substâncias inertes que atuam como estabilizantes da enzima.

Adotando o procedimento descrito no item 3.6.1, o suporte POS-PVA, previamente ativado com epícloridrina, foi utilizado para imobilizar as diferentes preparações de lipases. A

Tabela 4.3 apresenta os dados relativos aos teores de umidade, atividades hidrolítica e sintética e os rendimentos de imobilização obtidos para cada preparação de lipase.

Tabela 4.3 - Atividades hidrolítica e sintética dos derivados imobilizados em POS-PVA e rendimento de imobilização.

<i>Enzima</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Atividade hidrolítica (U/g)</i>	<i>Atividade sintética (U/g)</i>	<i>Rendimento de imobilização (%)</i>
Lipase PS	11,06	1460 ± 83,66	29,50 ± 1,65	15,83
Lipase AK	13,37	1210 ± 68,36	31,00 ± 1,34	25,35
Lipolase	15,75	1570 ± 75,42	24,50 ± 1,87	7,59
Piccantase R8000 [®]	16,47	2014 ± 78,56	12,70 ± 0,34	42,14
Lipase Pancreática	12,31	728 ± 4,72	7,5 ± 0,55	52,52

O teor de umidade do derivado imobilizado é um parâmetro crítico que afeta o equilíbrio da reação, sendo recomendada a utilização de derivados imobilizados com baixos teores de umidade para não favorecer a reversibilidade da reação, evitando desta forma, redução no rendimento da transesterificação. Assim sendo, especial atenção foi dada ao procedimento experimental de imobilização, para se obter derivados imobilizados com teores de umidade em níveis inferiores a 20%.

A atividade hidrolítica do derivado imobilizado é de crucial importância, pois além de fornecer dados referentes à recuperação de atividade catalítica no suporte (rendimento de imobilização), será utilizada no cálculo da massa do biocatalisador para mediar a reação de transesterificação. Conforme anteriormente estabelecido (DA ROS, 2009) uma quantidade mínima de 400 unidades de atividade por grama de óleo ou gordura é necessária para alcançar um bom rendimento de transesterificação. A atividade sintética informa a capacidade do derivado imobilizado de sintetizar um éster, ou seja, este dado pode estar diretamente relacionado com a capacidade do biocatalisador de mediar a reação de transesterificação.

Os rendimentos de imobilização das diferentes lipases variaram entre 7,6 a 52,5%. Com exceção das lipases de *R. oryzae* (Piccantase R8000[®]) e pancreática, todas as lipases resultaram em rendimentos de imobilização inferiores a 30%. O maior rendimento de imobilização foi obtido pela lipase pancreática, significando que esta preparação apresentou a maior afinidade pelo suporte. Entretanto, esse derivado apresentou baixa atividade sintética nas condições testadas (7,5 U/g).

As atividades hidrolíticas mais elevadas foram fornecidas pelos derivados imobilizados obtidos pelas lipases Piccantase R8000[®], Lipolase e PS.

Com relação à atividade sintética, os derivados obtidos pelas lipases AK, PS e Lipolase foram os que apresentaram atividade catalítica mais elevada.

Os distintos valores de rendimentos obtidos podem estar relacionados com as diferentes fontes de lipases avaliadas. Neste caso, as diferenças estruturais entre as moléculas protéicas de cada enzima resultaram em diferentes interações enzima-suporte, conforme constatado na literatura (PAULA *et al.*, 2009).

4.3. Seleção do derivado imobilizado para mediar a transesterificação do sebo bovino com etanol

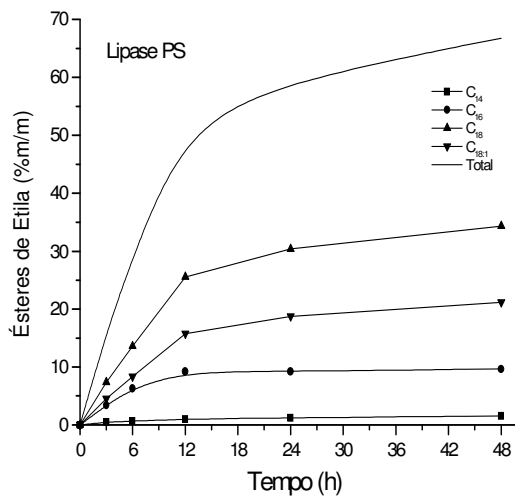
Os ensaios de transesterificação foram efetuados nas condições descritas no item 3.6.4 e os resultados obtidos referentes à formação de monoésteres de etila (biodiesel) em função do tempo são apresentados nas Figuras 4.1 (a-e). Os rendimentos em ésteres e produtividades alcançados para cada preparação de lipase testada são mostrados na Tabela 4.4.

As observações das Figuras 4.1 (a-e) indicam que o perfil dos ésteres formados foi particular para cada derivado imobilizado, mostrando a seletividade de determinadas lipases com relação ao tamanho de cadeia dos ácidos graxos presentes no sebo bovino.

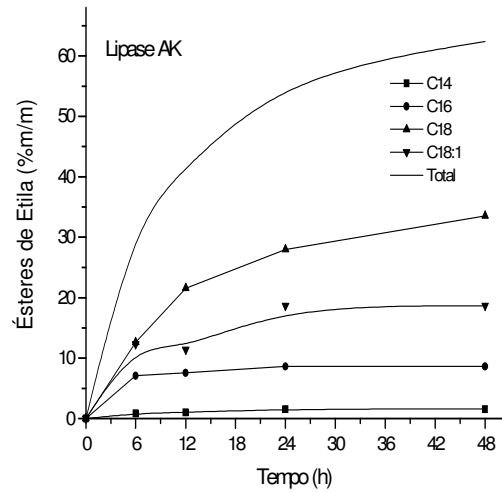
As lipases PS e AK apresentaram seletividade semelhante para os ácidos esteárico, oléico e palmítico (Figuras 4.1 a, b). A lipase pancreática, Figura 4.1 (d) apresentou seletividade para os ácidos oléico e esteárico, tendo praticamente alcançado o equilíbrio reacional em 24h. A lipase Piccantase R8000[®] foi a única preparação, entre as analisadas, que apresentou seletividade pelo ácido graxo de menor cadeia, o ácido mirístico, conforme mostrado na Figura 4.1 (e).

Desta forma, verifica-se que tanto a velocidade de reação quanto o rendimento em ésteres foram dependentes da fonte de lipase utilizada. Os máximos valores obtidos em concentração mássica de ésteres de etila variaram entre 1,7 a 66,8% m/m correspondendo, respectivamente, a rendimentos de 2,52 a 99,78% (Tabela 4.4).

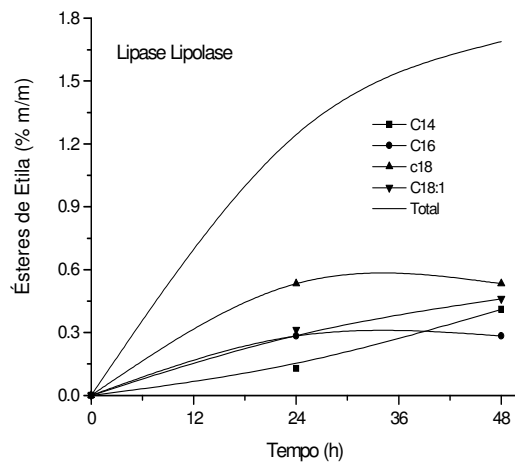
As lipases Piccantase e pancreática não foram eficazes na transesterificação do sebo bovino, confirmando o perfil já detectado pela dosagem da atividade sintética. A Lipolase também não foi efetiva na reação de transesterificação do sebo bovino com etanol, apesar de ter apresentado uma atividade sintética da ordem de 12,7 U/g.



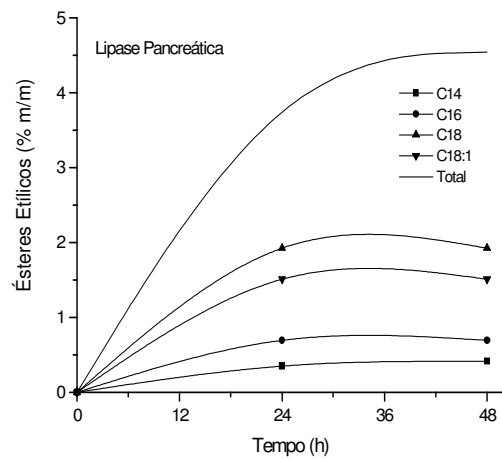
(a)



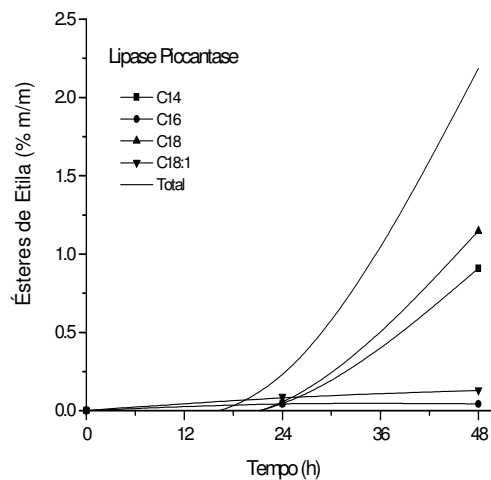
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 4.1. Perfil de formação dos ésteres de etila (-■-C14; -●-C16, -▲-C18, -▼-C18:1, -Total) em função do tempo de reação da etanolise do sebo bovino catalisada por diferentes lipases imobilizadas em POS-PVA. Todos os ensaios foram realizados a 45°C, sob agitação magnética. Lipase PS (a), Lipase AK (b), Lipolase (c), lipase Pancreática (d), Piccantase R8000 (e).

Os desempenhos mais elevados foram alcançados pela atuação das lipases AK e PS, alcançando, em 48 h, concentrações em ésteres, respectivamente, de 62,38 e 66,7% m/m, correspondendo a rendimentos de 93,26 e 99,78%.

Considerando que as lipases PS e AK apresentaram desempenhos similares na síntese de biodiesel a partir do sebo bovino, a seleção do biocatalisador mais eficiente foi baseada nas propriedades dos produtos transesterificados.

Tabela 4.4 - Resumo dos experimentos realizados utilizando diferentes lipases imobilizadas em POS-PVA ativado com epiclorigrina.

<i>Lipases</i>	<i>Rendimento de transesterificação (%)</i>	<i>Produtividade (mg/g.h)</i>
Lipase PS	99,78	13,90
Lipase AK	93,26	13,00
Lipolase	2,33	0,5
Piccantase R 8000	3,02	0,4
Lipase pancreática	6,20	1,8

4.4. Análise do produto transesterificado (biodiesel)

Os produtos obtidos na transesterificação do sebo bovino com etanol catalisada pelas lipases PS e AK foram purificados (separação do glicerol formado e extração de álcool residual no aparelho de rota-evaporador) e posteriormente analisados, incluindo viscosidade dinâmica, termogravimetria, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e RMN ¹H.

4.4.1. Viscosidade cinemática

A viscosidade pode ser usada como um parâmetro para o controle da reação de biodiesel, confirmando a conversão dos óleos vegetais ou gorduras animais em ésteres (KNOTHE *et al.*, 2006) pela redução acentuada da viscosidade da matéria-prima e do biodiesel.

Para a determinação da viscosidade do sebo bovino refinado foi adotada uma temperatura de 50°C, pois abaixo dessa temperatura o sebo bovino se encontrava em estado físico fora de especificação para operação do viscosímetro. As amostras de biodiesel obtidas pela atuação dos derivados imobilizados das lipases PS e AK, após as etapas de purificação foram analisadas a 40°C.

A Tabela 4.5 mostra os valores encontrados para a viscosidade do sebo bovino (43,82 cP) e das amostras de biodiesel obtidas pela atuação das lipases PS (5,98 cP) e AK (7,34 cP). Apesar de ambas amostras terem apresentado consistente redução da viscosidade, a amostra de biodiesel obtida na reação catalisada pela lipase PS forneceu a menor viscosidade, o que também confirma o valor mais elevado de conversão dos triglicérides em ésteres etílicos, como determinado por cromatografia de fase gasosa (Tabela 4.4).

Tabela 4.5 - Viscosidade do sebo bovino e das amostras de biodiesel obtidas nas reações catalisadas pela lipase PS e AK.

	<i>Sebo Refinado</i> (50°C)	<i>Biodiesel</i> (Lipase PS)	<i>Biodiesel</i> (Lipase AK)
Viscosidade Absoluta (cP)	43,82	5,89	7,34

4.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho

Outra técnica para monitoramento da transesterificação de óleos e gorduras é a espectroscopia na região do infravermelho (MONTEIRO *et al.*, 2008).

A Figura 4.2 apresenta as bandas de vibração obtidas dos espectros na região de infravermelho das amostras de sebo bovino e do biodiesel sintetizado pela atuação das lipases PS e AK.

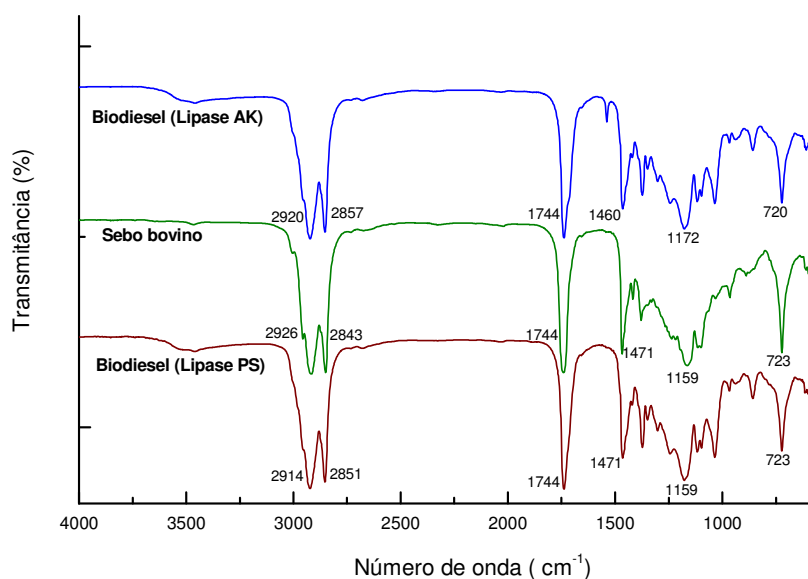


Figura 4.2. Espectro na região do infravermelho das amostras de sebo bovino refinado e do biodiesel sintetizado pelas lipases PS e AK.

A amostra de sebo bovino apresentou um espectro com bandas de vibração relacionadas aos triglicerídeos em 1159 e 1733 cm^{-1} , respectivamente, referentes aos estiramentos dos grupos C-O e C=O. Apresentou também absorção em comprimentos de onda de 2848 e 2917 cm^{-1} referente a ligação C-H.

Para o espectro da amostra de biodiesel obtido pela atuação da lipase AK, verificou-se apenas um pequeno deslocamento das bandas de absorção quando comparados aos estiramentos do sebo bovino, fato não observado com amostra de biodiesel obtido pela atuação da lipase PS. Esse tipo de comportamento é similar ao reportado na literatura para amostras de sebo bovino e biodiesel obtido desta matéria-prima lipídica. Em se tratando de um triéster (sebo bovino) e após a reação de transesterificação se formam mono e di ésteres, era de se esperar que as curvas estivessem no mesmo comprimento de onda (MOTHÉ *et al.*, 2005; MOURA *et al.*, 2006; STUART; GEORGE; MCINTYRE, 1996).

4.4.3. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica gera como resultado uma curva de decomposição térmica que informa as etapas de degradação das amostras em função da temperatura. Por meio da análise desses dados, é possível estabelecer parâmetros de estabilidade térmica da gordura *in-natura* e o biodiesel obtido. Além disso, essas informações dizem respeito à qualidade e as propriedades do biocombustível, permitindo classificar o produto como sendo confiável e consistente com os padrões de qualidade exigidos pelas normas oficiais.

As Figuras 4.3 (a) e (b), relacionadas, respectivamente, aos gráficos de TG e DTG, apresentam os resultados dessa análise para as amostras de sebo bovino e do biodiesel obtido na transesterificação empregando as lipases PS e AK. Os dados referentes às etapas de degradação térmica são apresentados na Tabela 4.6.

O sebo bovino se mostrou estável termicamente até a temperatura de 210°C, demonstrando apenas um estágio de degradação térmica entre 210-560°C, com perda de massa de 99% referente à decomposição térmica de triglicerídeos. A amostra de biodiesel transesterificado com a lipase PS apresentou apenas um estágio de decomposição térmica na faixa de temperatura de 128–290°C, com perda de massa de aproximadamente 98% referente à decomposição dos ésteres etílicos.

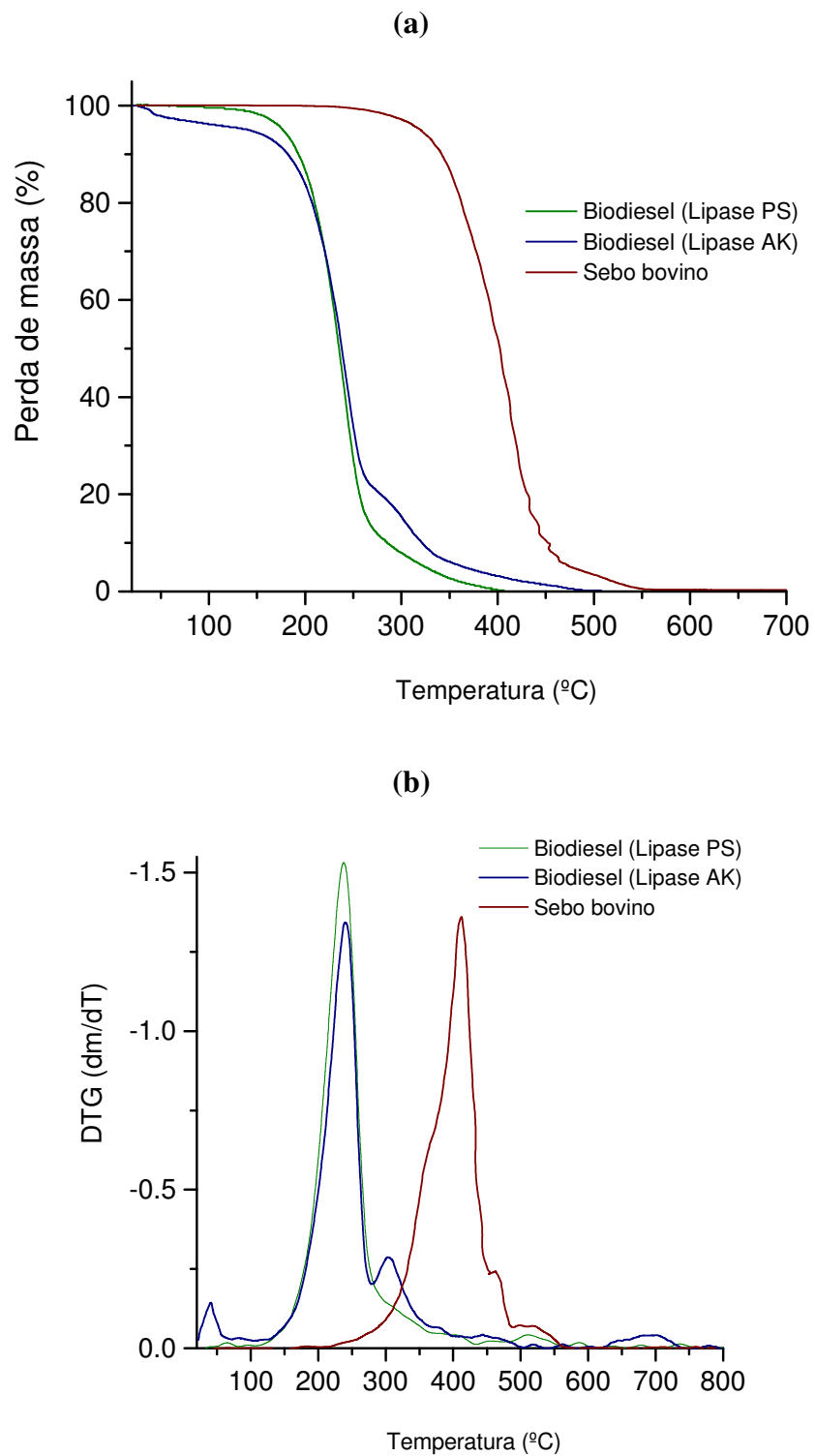


Figura 4.3. Análise termogravimétrica das amostras de sebo bovino (linha vermelha) e do biodiesel sintetizados pela atuação das lipases PS (linha verde) e AK (linha azul). (a) TG, (b) DTG.

Tabela 4.6 - Etapas e temperaturas de degradação térmica para as amostras de sebo bovino, biodiesel sintetizado pela atuação das lipases PS e AK.

<i>Amostra</i>	<i>Etapa</i>	<i>T_{inicial} (°C)</i>	<i>T_{final} (°C)</i>	<i>Δ_{massa}(%)</i>
Sebo Bovino	1	210	560	99,00
Biodiesel (Lipase PS)	1	128	290	98,00
Biodiesel (Lipase AK)	1	26	56	4,46
	2	124	280	75,84
	3	280	505	19,70

Com relação à amostra de biodiesel preparado com a lipase AK, observaram-se três estágios de degradação térmica. O primeiro ocorreu na faixa de temperatura de 26–56°C, com perda de massa de 4,46%, devido à presença de umidade na amostra. O segundo estágio ocorreu na faixa de temperatura de 124–280°C, com perda de massa de 75,84%, referente à decomposição de ésteres etílicos. O terceiro estágio ocorreu na faixa de temperatura de 280–365°C, com perda de massa 19,70%, referente à decomposição de mono, di e triglicerídeos não convertidos em ésteres.

Esses resultados são similares aos descritos por Moura *et al.* (2006) em amostra de biodiesel obtido por transesterificação química (KOH) do sebo bovino com metanol. Uma perda de massa de 96,08% referente a decomposição de ésteres metílicos foi observada na faixa temperatura entre 119,12–283,34°C. Adicionalmente, na faixa de temperatura de 283,34–492,59 °C com uma perda de massa de 3,08% referente à decomposição térmica de resíduos de mono, di e triglicerídeos.

No caso da amostra de biodiesel obtida com a lipase de PS, foi observada apenas a faixa de temperatura de degradação térmica dos ésteres de etila. Esse fato indica a ausência de triglicerídeos na amostra de biodiesel, confirmando os dados de elevado rendimento, apresentado na Tabela 4.4.

4.4.4. Ressonância magnética nuclear de próton

Informações adicionais referentes à qualidade das amostras de biodiesel foram obtidas por análise de RMN ¹H como mostrado na Figura 4.4. Esses grupos são atribuídos como segue (MONTEIRO *et al.*, 2008): a) prótons olefínicos e próton metilênicos do glicerol; b) prótons metilênicos do glicerol; c) prótons α-carboxílicos; d) prótons alílicos externos; e) β-carboxílicos; f) prótons metilênicos dos ácidos graxos do triacilglicerol; g) prótons metílicos terminais.

Como verificado na Figura 4.4 um multiplete em 4,10-4,32 ppm (sinal b) referentes aos prótons dos carbonos 1 e 3 da molécula do glicerol desaparecem completamente, devido à conversão de triglicerídeos. A formação dos ésteres etílicos pode ser observada na região em 4,0-4,2 ppm, sendo representada por um quarteto. A partir destes espectros foi possível concluir que a reação de transesterificação do sebo bovino ocorreu com sucesso.

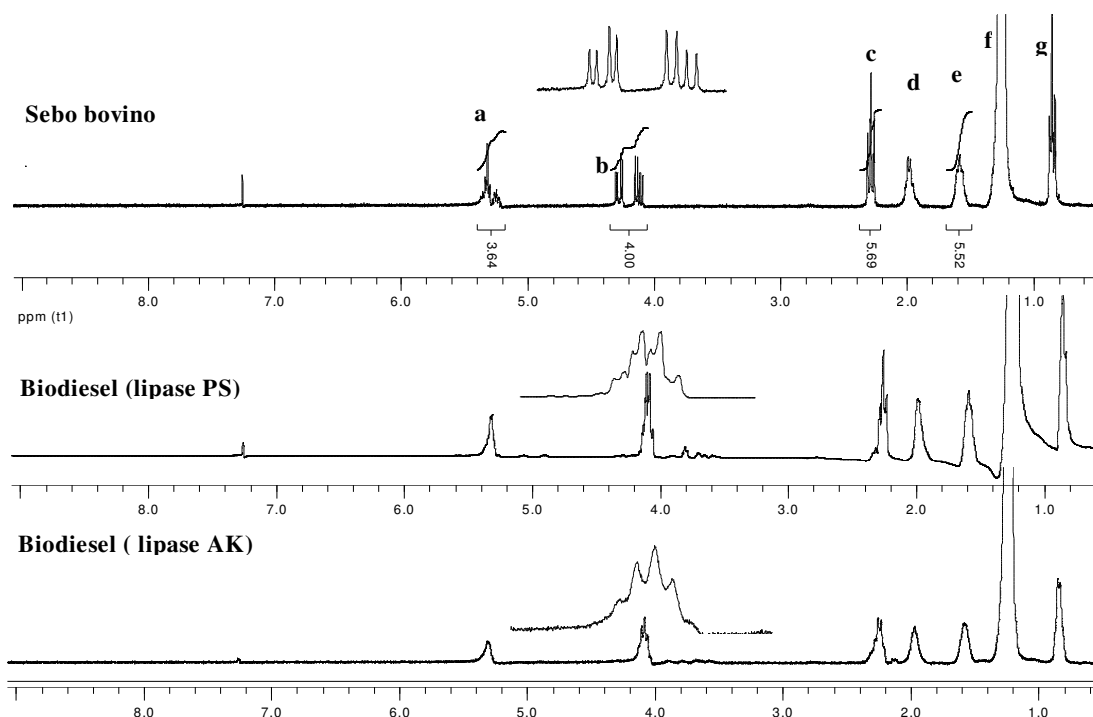


Figura 4.4. Ressonância magnética nuclear de prótons das amostras de sebo bovino e do biodiesel sintetizado pelas lipases PS e AK.

Com base nesses dados, foi possível concluir que o biodiesel obtido pela atuação da lipase PS apresentou um melhor conjunto das propriedades quando comparadas com o biodiesel obtido com a lipase AK. Esse resultado é bastante similar ao obtido por Hsu *et al.* (2001) que também demonstraram que a lipase de *Pseudomonas cepacia* foi a mais eficiente na transesterificação de sebo bovino com etanol, alcançando uma conversão da ordem de 95% em 24h e a adição de peneira molecular na proporção de 0,4% em relação ao substrato auxiliou no controle da reação reversa (hidrólise). Em outro trabalho e mesmo adotando diferentes condições reacionais (utilizando hexano como solvente) esta preparação de lipase foi também reportada como a mais efetiva para catalisar a conversão de sebo bovino em ésteres metílicos (NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996).

4.5. Propriedades bioquímicas, cinéticas do derivado selecionado para aplicação na reação de transesterificação do sebo bovino.

Tendo selecionado o derivado imobilizado mais efetivo para mediar a síntese de biodiesel a partir do sebo bovino, as propriedades bioquímicas, cinéticas e de estabilidade térmica da lipase PS imobilizada em POS-PVA foram determinadas, para permitir melhor conhecimento desses parâmetros, sobre a reação enzimática e, portanto, utilizar plenamente a potencialidade catalítica desse derivado imobilizado.

4.5.1. Propriedades bioquímicas

A determinação das propriedades bioquímicas (pH e temperatura) foi realizada com o auxílio da metodologia de superfície de resposta, uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas, que tem se mostrado útil no desenvolvimento e otimização de diversos processos (SANTOS; CASTRO, 2006). Permite ainda a obtenção de modelos matemáticos que, apesar de empíricos, possibilitam o levantamento e a comprovação de hipóteses científicas que buscam explicar relações de causa e efeito entre os resultados experimentais e as variáveis em estudo. Apesar de amplamente utilizada nas últimas décadas, a metodologia de superfície de resposta foi apenas nos últimos anos empregada para estudos associados à cinética enzimática (BOYACI, 2005; ANDERSON; ADLERCREUTZ, 1999), sendo este tipo de trabalho ainda pouco relatado na literatura.

Neste trabalho foi adotado um planejamento fatorial 2^2 estrela rotacional com três replicatas no ponto central para se determinar as melhores condições de pH e temperatura para a atividade hidrolítica das lipases livre e imobilizada. A matriz do planejamento é apresentada na Tabela 4.7, juntamente com os resultados experimentais. Os resultados foram avaliados utilizando-se o programa Design-Expert 6.0 (Stat-Ease Corporation, USA). As estimativas dos efeitos, erros-padrão e do valor de p para a resposta analisada são apresentadas na Tabela 4.8.

Para a lipase livre, os valores de atividade hidrolítica variam entre 24284 a 54756 U/g, sendo os valores mais elevados de atividade obtida no ponto central (pH = 7,5 e temperatura = 50 °C). Verifica-se para a variável temperatura que tanto seu termo linear quanto o quadrático apresentaram influência significativa ao nível de 95% de confiança. Por outro lado, para a variável pH, somente o termo quadrático foi significativo a 95% de confiança ($p > 0,1$).

Tabela 4.7 - Resultados obtidos no planejamento experimental para avaliação do efeito das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da lipase PS livre e imobilizada.

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis codificadas</i>		<i>Variáveis reais</i>		<i>Atividade Hidrolítica (U/g)</i>	
	pH	T(°C)	pH	T(°C)	Livre	Imobilizada
1	-1	-1	6,5	40	33956	1468
2	1	-1	8,5	40	32812	2650
3	-1	1	6,5	60	44564	1381
4	1	1	8,5	60	48204	2717
5	0	0	7,5	50	54080	1902
6	0	0	7,5	50	52156	1962
7	0	0	7,5	50	54756	1911
8	-1,414	0	6,1	50	44200	1295
9	1,414	0	8,9	50	50024	2335
10	0	-1,414	7,5	36	24284	1973
11	0	1,414	7,5	64	32552	1979

Tabela 4.8 - Estimativas dos efeitos das variáveis, erro padrão e valores de *p* para a atividade hidrolítica da lipase PS livre e imobilizada segundo os resultados dos planejamentos.

<i>Variáveis</i>	<i>Lipase livre</i>			<i>Lipase imobilizada</i>		
	Efeito	Erro padrão	Valor <i>p</i>	Efeito	Erro padrão	Valor <i>p</i>
Media	53655	± 779	0,0000*	1999	± 12	0,0000*
X ₁ (Linear)	2685	± 955	0,1067	1259	± 32	0,0007*
X ₁ (Quadrático)	-5469	± 1140	0,0408*	-----	-----	-----
X ₂ (Linear)	9443	± 955	0,0100*	-10	± 32	0,7865
X ₂ (Quadrático)	-24275	± 1140	0,0022*	-----	-----	-----
X ₁ .X ₂	2392	± 1349	0,2182	77	± 32	0,1403

* Significativos com 95% de confiança; X₁ e X₂ representam a variável pH e temperatura, respectivamente.

Para a lipase imobilizada, os valores de atividade hidrolítica variaram entre 1381 a 2717 U/g. As atividades mais elevadas foram obtidas no nível alto para o pH (8,5) para uma ampla faixa de temperatura. Verifica-se ainda que para a variável pH, somente o termo linear apresentou significância com 95% de confiança, não sendo constatado nenhum outro termo significativo.

A partir dos resultados da Tabela 4.8, foi possível compor os modelos estatísticos incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos. Os coeficientes relativos aos efeitos não significativos foram excluídos do modelo referente a atividade hidrolítica da lipase livre, exceto quando eram necessários para manter a hierarquia do modelo (MYERS; MONTGOMERY, 1995). Os coeficientes relativos aos efeitos não significativos, ou seja,

temperatura e interação entre pH e temperatura também foram excluídos do modelo referente a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada.

As equações dos modelos obtidos são apresentadas na Tabela 4.9, obtendo-se as superfícies de resposta e curvas de nível apresentadas nas Figuras 4.5 e 4.6.

Tabela 4.9- Modelos obtidos pela superfície de resposta gerada no planejamento experimental, considerando a atividade enzimática (A, U/g) como função dos valores codificados de pH (x_1) e temperatura (x_2).

<i>Lipase</i>	<i>Modelos</i>	R^2
Livre	$A \text{ (U/g)} = 53655 + 1343.X_1 - 2734.X_1^2 + 4721.X_2 - 12137.X_2^2$	0,9545
Imobilizada	$A \text{ (U/g)} = 1199 + 630.X_1$	0,9774

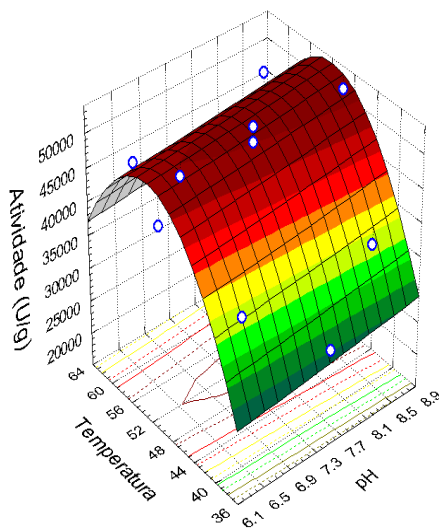


Figura 4.5. Superfície de resposta de acordo com a equação predita para a atividade hidrolítica da lipase PS livre.

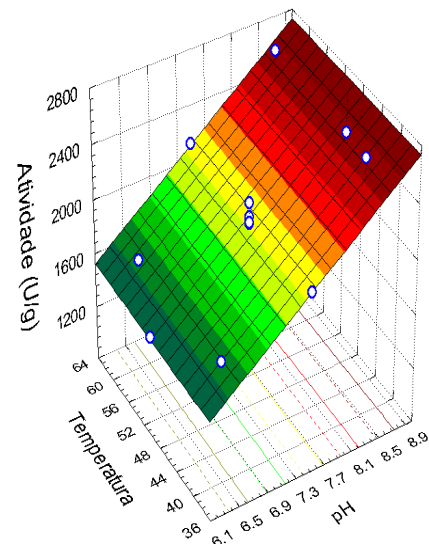


Figura 4.6. Superfície de resposta de acordo com a equação predita para a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada.

A Figura 4.5 mostra a superfície de resposta referente a lipase PS livre que apresentou um valor de pH (7,5) e temperatura (52°C) para a qual a atividade hidrolítica foi máxima, e os pontos são os valores de atividade obtidos experimentalmente. A Figura 4.6 mostra a superfície de resposta referente a lipase PS imobilizada em POS-PVA que apresentou um valor de pH (8,9), com uma ampla faixa da temperatura (36 a 58°C) para o qual a atividade hidrolítica foi máxima.

O teste de análise de variância dos modelos (ANOVA, Tabela 4.10 e 4.11), indicaram que a falta de ajuste do modelo não foi significativa com nível de 95% de confiança ($p > 0,05$).

Verifica-se ainda, pelo valor de R^2 , que a equação ajustada foi capaz de explicar mais de 90% da variabilidade dos valores experimentais tanto para a lipase livre quanto para a imobilizada. Desta forma, considerou-se que os modelos estatísticos obtidos foram adequados para descrever a atividade hidrolítica da lipase (livre e imobilizada) em função do pH e temperatura.

Tabela 4.10 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade hidrolítica da lipase PS livre.

Variáveis	Soma Quadrática ($\times 10^{-3}$)	Graus de Liberdade	Média Quadrática ($\times 10^{-3}$)	F	
				Valores	Prob > F
X_1	14375	1	14375	7.8993	0,1067
X_1^2	41883	1	41883	23.0152	0,0408*
X_2	177793	1	177793	97.6999	0,0101*
X_2^2	825221	1	825221	453.47	0,0022*
Falta de Ajuste	44997	4	11249	6.1815	0,1441
Erro Puro	3640	2	1820		
Cor total	1069960	10			

*significante com nível de 95% de confiança

Tabela 4.11 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada em POS-PVA.

Variáveis	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	
				Valores	Prob > F
X_1	1585081	1	1585081	1513,92	0,0006*
Falta de Ajuste	34556	3	11519	11,00	0,0845
Erro Puro	2094	2	1047		
Cor total	1621731	6			

*significativo ao nível de 95% de confiança

4.5.2. Parâmetros cinéticos

Nas Figuras 4.7 e 4.8 são apresentadas as atividades da lipase livre e imobilizada, respectivamente, em função da concentração de ácidos graxos presentes na emulsão óleo e água contendo diferentes proporções de azeite de oliva (10-70% m/v). Os resultados obtidos sugerem que a atividade de ambas formas de lipase (livre e imobilizada), em função da concentração de ácidos graxos, segue cinética do tipo Michaelis-Menten, indicando que na faixa de concentração estudada não se detectou uma possível inibição por produtos de reação ou pela redução do teor de água no meio reacional.

As constantes de afinidade pelo substrato (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram calculadas com o auxílio do programa Enzyme Fitter e os modelos propostos levaram

aos resultados apresentados na Tabela 4.12. O menor valor de K_m determinado para a lipase imobilizada, indica que mediante imobilização a afinidade da lipase pelo substrato foi incrementada. Esse comportamento pode ser atribuído a um provável efeito de purificação da lipase livre que pode ter ocorrido durante o procedimento de imobilização. Esse efeito já foi reportado para diferentes fontes lipase quando imobilizada no suporte híbrido POS-PVA, demonstrando a compatibilidade desse suporte pela enzima lipase (PAULA *et al.*, 2007; PAULA *et al.*, 2008).

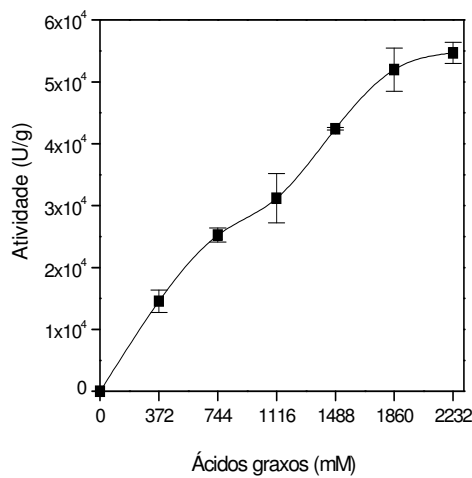


Figura 4.7. Atividade hidrolítica da lipase de *Pseudomonas cepacia* livre em função da concentração do substrato.

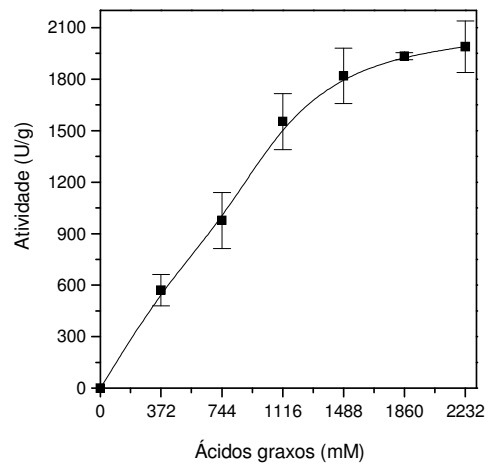


Figura 4.8. Atividade hidrolítica da lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em função da concentração do substrato.

Tabela 4.12 - Valores de k_m e V_{max} obtidos a partir das curvas da atividade hidrolítica em função da concentração do substrato.

<i>Lipase</i>	k_m (mM)	V_{max} (U/g)
PS livre	4.018	56.441
PS imobilizada	1.883	3.873

4.5.3. Constante de desativação térmica da lipase livre e imobilizada

Experimentos foram efetuados para determinar a constante de desativação térmica (k_d), e o tempo de meia-vida da lipase PS livre e imobilizada em POS-PVA sob efeito da temperatura de 60 °C. As atividades residuais da lipase PS livre e do derivado imobilizado após tratamento térmico foram plotadas na Figura 4.9 e utilizadas para calcular a constante de desativação térmica (k_d) e o tempo de meia-vida (Tabela 4.13).

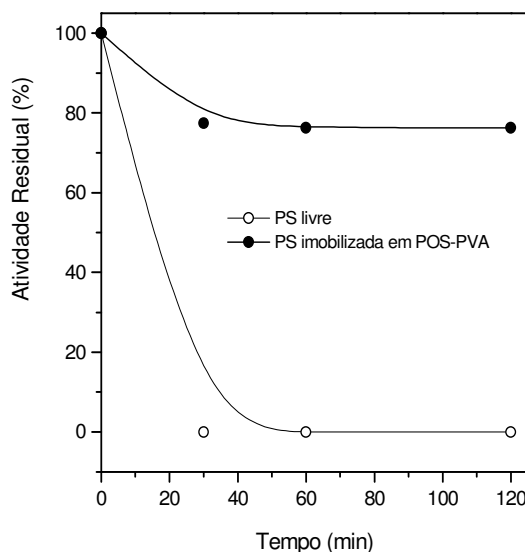


Figura 4.9. Desativação térmica da lipase PS livre e imobilizada em POS-PVA (experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 sob temperatura de 60 °C, considerando como 100% a atividade da lipase livre em 43290 U/g e do derivado imobilizado em 2009 U/g).

Os testes de estabilidade térmica demonstraram uma influência positiva do método de imobilização na estabilidade da lipase, revelando um tempo de meia-vida da lipase imobilizada em POS-PVA da ordem de 6,24 h, enquanto a enzima livre foi totalmente desnaturada após 30 min de incubação a 60°C (tempo de meia-vida= 0,36h). Esse valor corresponde a um aumento da estabilidade térmica de aproximadamente 17 vezes da lipase imobilizada em POS-PVA.

Tabela 4.13 - Constantes de inativação térmica da lipase livre e imobilizada e seus respectivos tempos de meia-vida.

<i>Lipase</i>	K_d (h^{-1})	<i>Tempo de meia-vida</i> (h)
Livre	1,92	0,36
Imobilizada	0,11	6,24

4.5.4. Espectro na região do Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) foi também utilizada para comprovar a eficiência do método de preparação do derivado imobilizado no que se refere à incorporação da lipase PS no suporte. Na Figura 4.10 estão apresentados os espectros da lipase livre e do derivado imobilizado. Verifica-se que o pico característico da lipase PS que

envolve o grupamento amino primário ($-\text{NH}_2$) decorrente da vibração de deformação N-H primária, está também presente no derivado imobilizado.

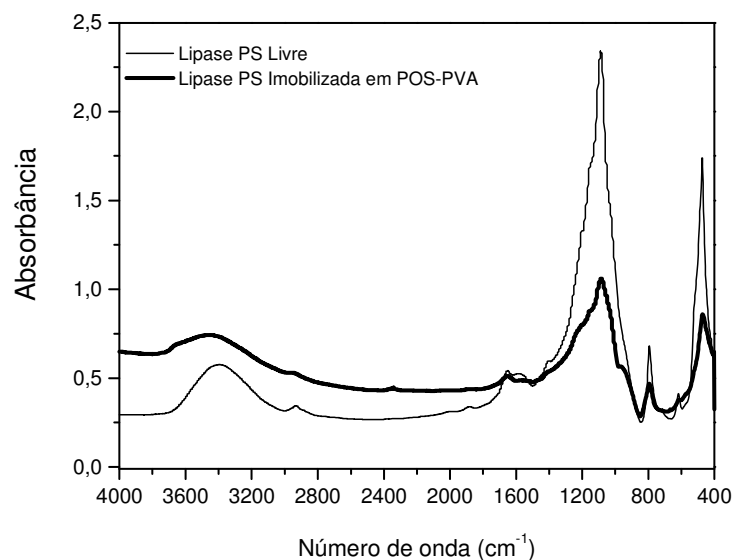


Figura 4.10. Espectro na região do infravermelho da lipase PS livre e imobilizada em POS-PVA.

Os dados descritos nesta seção (4.5) permitiram definir as principais características bioquímicas e cinéticas da lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em POS-PVA, permitindo utilizar plenamente a potencialidade catalítica desse derivado imobilizado na síntese proposta. As principais características da lipase livre e imobilizada em POS-PVA descritas nesta seção estão sumarizadas na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Características bioquímicas e cinéticas das preparações de lipase PS livre e imobilizada em POS-PVA.

<i>Propriedades catalíticas</i>	<i>Lipase</i>	
	Livre	Imobilizada
pH ótimo	7,5	8,5
Temperatura ótima (°C)	50	60
k_d (60°C)	1,92	0,11
Tempo de meia-vida 60°C (h)	0,36	6,24
K_m (mM)	4018	1883
V_{max} (U/g)	56441	3873

4.6-Otimização das condições de transesterificação enzimática do sebo bovino com etanol catalisada pela lipase PS imobilizada em POS-PVA

Nesta etapa do trabalho foi adotado um planejamento estrela rotacional com três replicatas no ponto central visando determinar a influência da temperatura e razão molar na síntese de biodiesel empregando a lipase selecionada. O perfil de formação dos monoésteres de etila para cada ensaio efetuado em função do tempo é mostrado na Figura 4.11. Como variável de resposta foi considerado o rendimento de transesterificação em 6h de reação. A matriz experimental e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial 2^2 estrela rotacional utilizado para avaliar a influência das variáveis: temperatura e razão molar no rendimento da transesterificação do sebo bovino e etanol.

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis codificadas</i>		<i>Variáveis reais</i>		<i>Rendimento de transesterificação (%)</i>
	<i>T (°C)</i>	<i>Razão Molar (etanol/sebo)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Razão Molar (etanol/sebo)</i>	
1	-1	-1	48	7	92,02
2	1	-1	58	7	80,15
3	-1	1	48	12	87,45
4	1	1	58	12	75,62
5	0	0	53	9,5	91,13
6	-1,414	0	46	9,5	100
7	1,414	0	60	9,5	74,51
8	0	-1,414	53	6	91,84
9	0	1,414	53	13	86,73
10	0	0	53	9,5	87,57
11	0	0	53	9,5	88,79

Os resultados obtidos indicam que a lipase PS imobilizada em POS-PVA foi capaz de formar os monoésteres de etila em todas as condições ensaiadas. Os rendimentos globais variaram entre 74,51 a 100%. O rendimento mais elevado foi verificado na reação realizada em meios contendo etanol e sebo bovino numa razão molar 9,5 e temperatura de 46°C (ensaio 6).

As estimativas dos efeitos, erros-padrão e do valor de p para a resposta analisada são apresentadas na Tabela 4.16. Dentro da região analisada, verifica-se que os rendimentos de transesterificação foram dependentes das variáveis lineares (X_1 , X_2), temperatura e razão molar, sendo que somente o termo linear da variável temperatura foi significativo ao nível de 95%. As variáveis quadráticas, bem como a interação, não foram estatisticamente significativas.

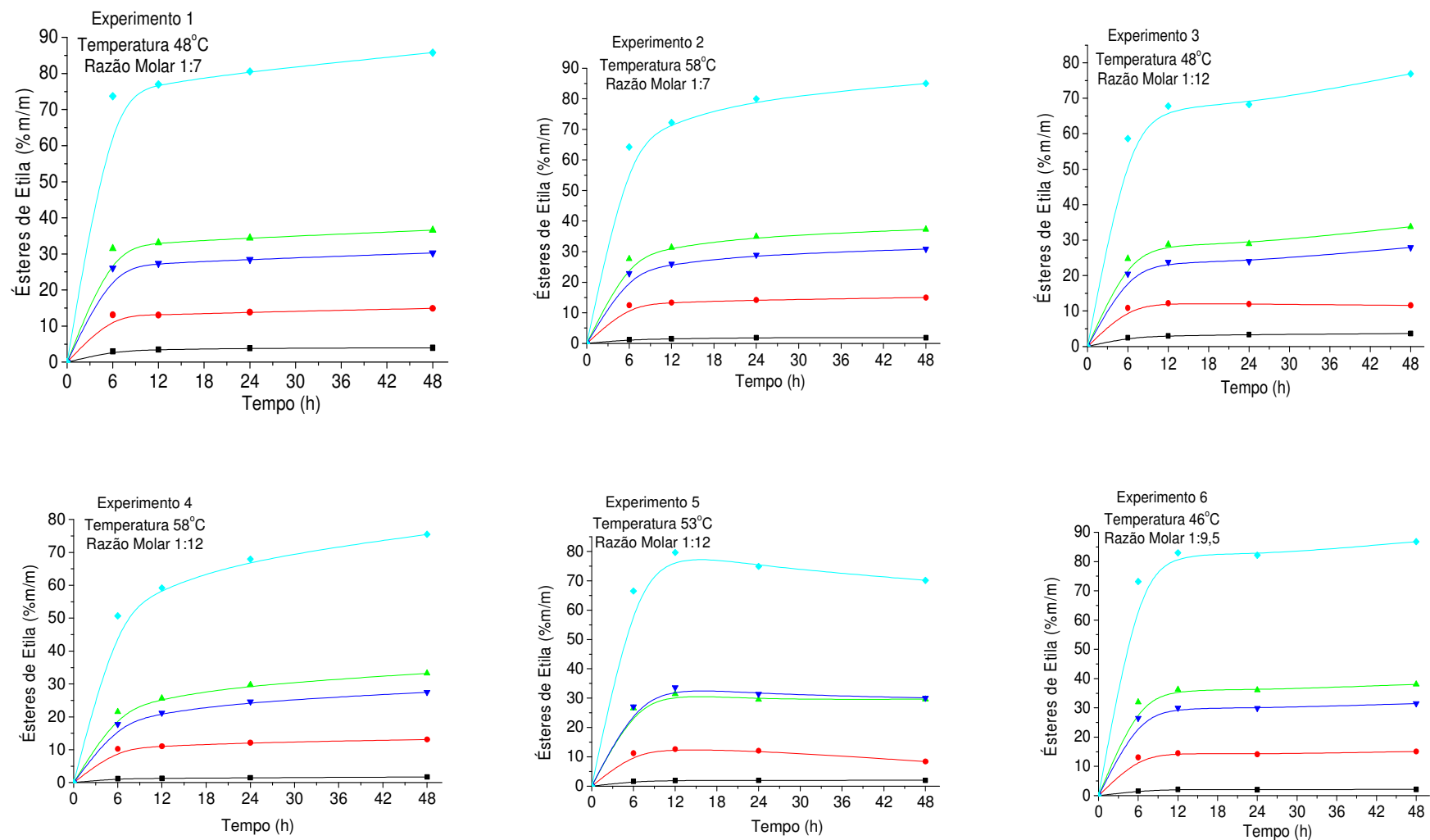


Figura 4.11. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C14; -●-C16, -▲-C18, -▼- C18:1, -◆-Total) na reação de transesterificação do sebo bovino empregando lipase PS imobilizada em POS-PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaios 1 a 6).

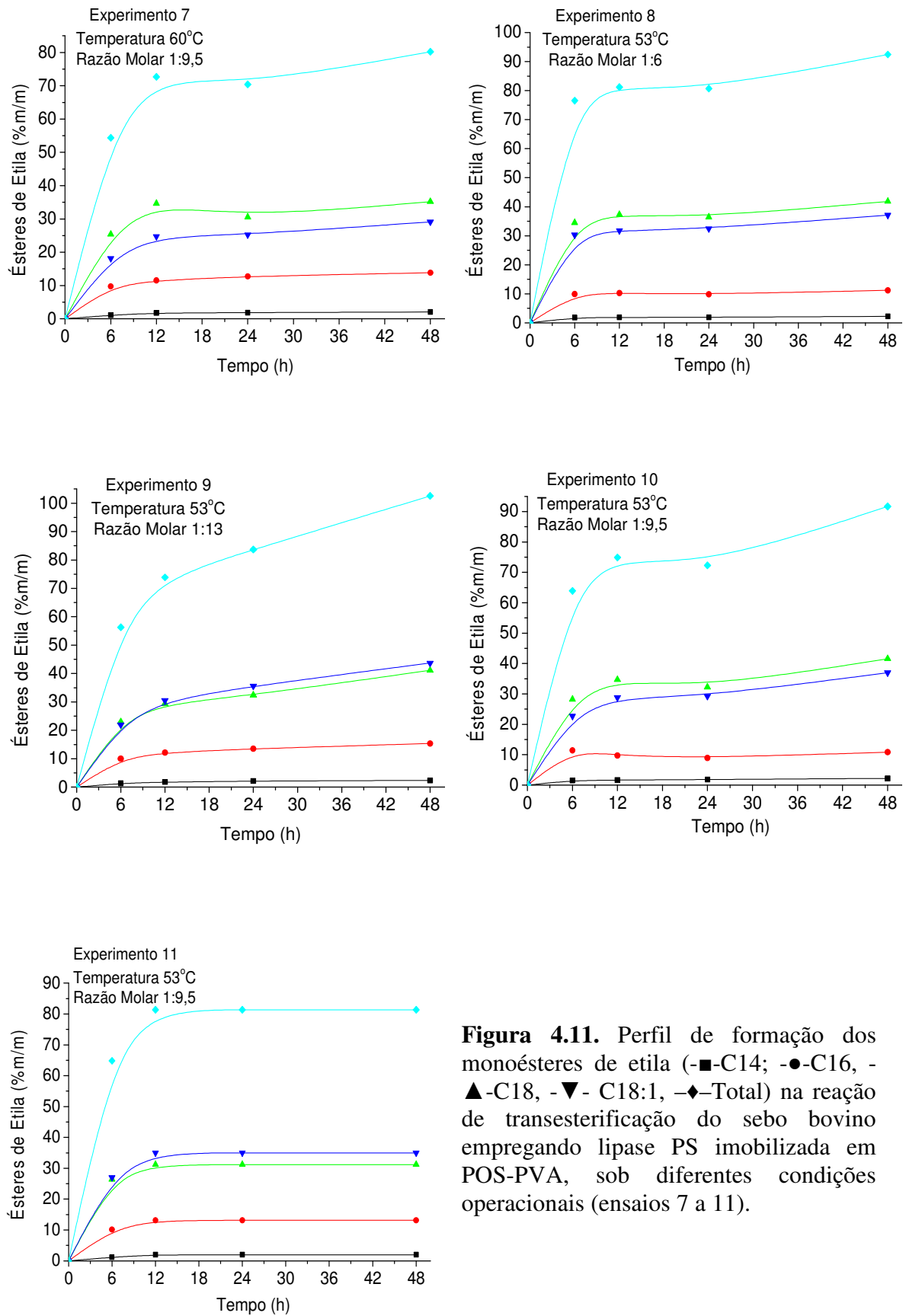


Figura 4.11. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C14; -●-C16, -▲-C18, -▼- C18:1, -◆-Total) na reação de transesterificação do sebo bovino empregando lipase PS imobilizada em POS-PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaios 7 a 11).

Tabela 4.16- Estimativas dos efeitos das variáveis, erro padrão e valores de p para o rendimento de transesterificação segundo os resultados do planejamento estrela rotacional.

<i>Variáveis</i>	<i>Rendimento</i>		
	Efeito	Erro padrão	Valor p
Media	86,84	± 0,54	0,0000 ^a
X ₁ (Linear)	-14,94	± 1,28	0,0073 ^a
X ₂ (Linear)	-4,29	± 1,28	0,0785 ^b

^asignificativo ao nível de 95%, ^bsignificativo ao nível de 90%

A partir desses dados, foi possível compor o modelo estatístico incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos, como apresentado na equação 4.1, em que: **R** representa o rendimento de transesterificação (%); **X₁** é o valor codificado da variável temperatura e **X₂** o valor codificado da variável razão molar.

$$R (\%) = 86,84 - 7,47 \cdot x_1 - 2,15 \cdot x_2 \quad \text{Equação 4.1}$$

A análise de variância do modelo estatístico (Tabela 4.17) indicou significância estatística ao nível de 95% de confiança, não sendo constatada falta de ajuste ($p= 0,2065$). Verifica-se ainda pelo valor de R^2 que a equação ajustada foi capaz de explicar 84,56% da variabilidade dos valores experimentais. Desta forma, considerou-se que o modelo estatístico foi adequado para descrever o rendimento de transesterificação em função da temperatura e razão molar na síntese de biodiesel a partir do sebo bovino, obtendo-se a superfície de resposta apresentada na Figura 4.12. Os valores preditos pelo modelo representado na superfície de resposta indicam que o rendimento de transesterificação foi maximizado numa temperatura de 46°C e razão molar sebo bovino/ etanol em 1:6.

Tabela 4.17 - Análise de variância (ANOVA) para os rendimentos de transesterificação do sebo bovino com etanol.

<i>Variáveis</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>F</i>	
				Valores	Prob > F
Modelo	483,11	2	241,55	21,91	0,0006
Temperatura X ₁	446,23	1	446,23	40,47	0,0002
Razão Molar X ₂	36,87	1	36,87	3,34	0,1048
<i>Falta de ajuste</i>	81,66	6	13,61	4,16	0,2065
Erro Puro	6,55	2	3,27		
Cor Total	571,31	10			
$R^2 = 0,8456$					

F: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

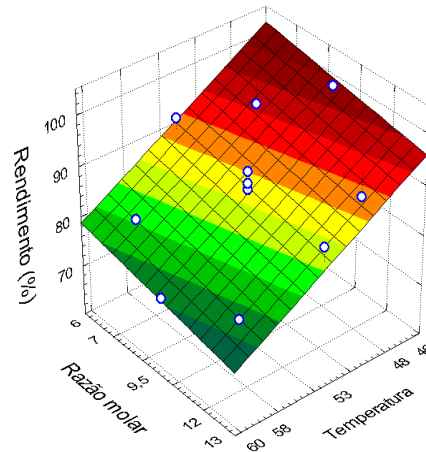


Figura 4.12.- Superfície de resposta para o rendimento de transesterificação do sebo bovino e etanol catalisada pela lipase PS imobilizada em POS-PVA em função da temperatura e razão molar, de acordo com o modelo predito pela equação 4.1.

Empregando-se o programa Design-Expert 6.0, procedeu-se à busca dos valores máximos de rendimento da transesterificação enzimática do sebo bovino com etanol. Desta forma, para se obter rendimentos superiores a 95%, é necessário trabalhar em condições reacionais delimitadas, como apresentada pela Figura 4.13 (região em amarelo), sendo selecionado a condição de nível baixo para ambas variáveis (temperatura =48°C e razão molar sebo:etanol 1:7).

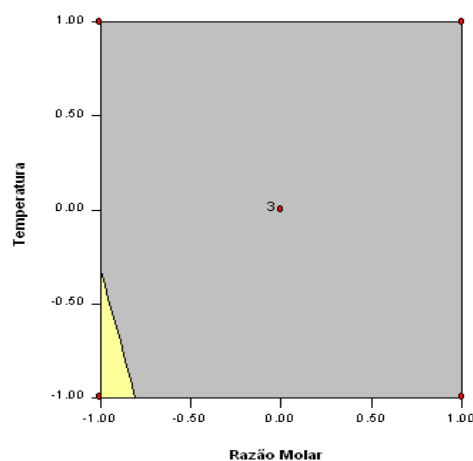


Figura 4.13. Rendimento de transesterificação em função dos resultados obtidos pelo planejamento experimental.

4.7- Estabilidade térmica das amostras de biodiesel

As amostras obtidas nas reações de transesterificação conduzidas de acordo com o planejamento fatorial foram também submetidas à análise termogravimétrica para determinar a estabilidade térmica do biodiesel originado em cada condição reacional. As curvas de TG obtidas em cada condição experimental testada estão ilustradas na Figura 4.14.

As diversas amostras de biodiesel apresentaram uma semelhança notável, tendo um primeiro estágio de decomposição térmica na faixa de temperatura entre 28 a 90°C, referente à presença de umidade. O segundo estágio de perda de massa na faixa de 135–285°C, referente à decomposição térmica dos ésteres etílicos. O terceiro estágio com perda de massa na faixa entre 340–420°C, referente à decomposição térmica de mono, di e triglicerídeos que não foram convertidos a ésteres.

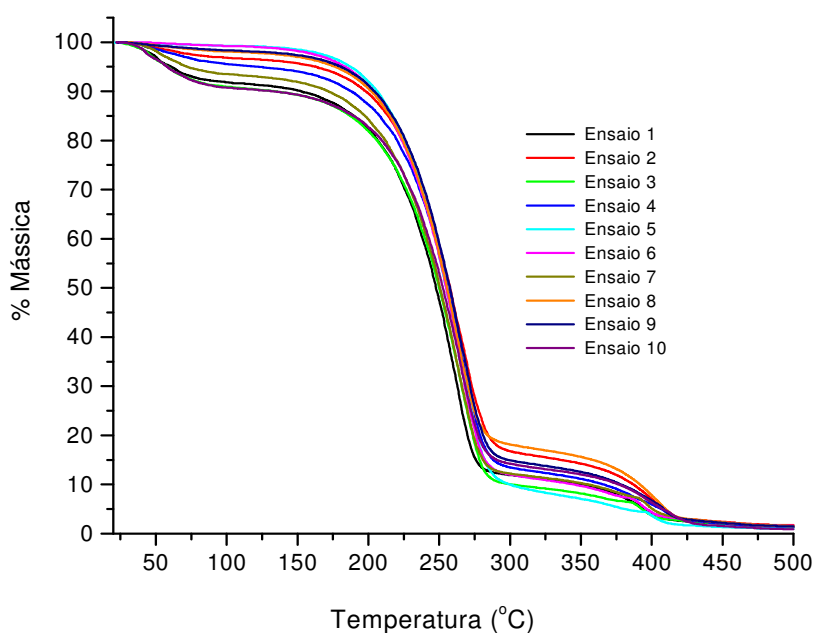


Figura 4.14. Análise termogravimétrica das amostras de biodiesel obtidas na reação transesterificação do sebo bovino com etanol catalisada pela lipase PS imobilizada sob diferentes condições reacionais.

Esse comportamento similar, de todas as curvas apresentarem o mesmo perfil de degradação térmica, já era esperado, tendo em vista que as amostras de biodiesel foram submetidas ao teste de estabilidade térmica (TG) após 48 h de reação, quando conversões superiores a 90% já tinham sido alcançadas em todas as condições testadas.

Para permitir uma melhor visualização do efeito das condições operacionais adotadas

(efeito da temperatura e da razão molar) as curvas termogravimétricas referentes aos ensaios 1 e 2 (temperaturas diferentes 48 e 58°C para meios constituídos com materiais de partida na mesma razão molar sebo: etanol de 1:7) e ensaios 5 e 9 (mesma temperatura de 53°C para meios constituídos com diferentes razões molares entre sebo e etanol = 1/9,5 e 1/13) foram plotadas separadamente, como mostrado nas Figuras 4.15 e 4.16, respectivamente.

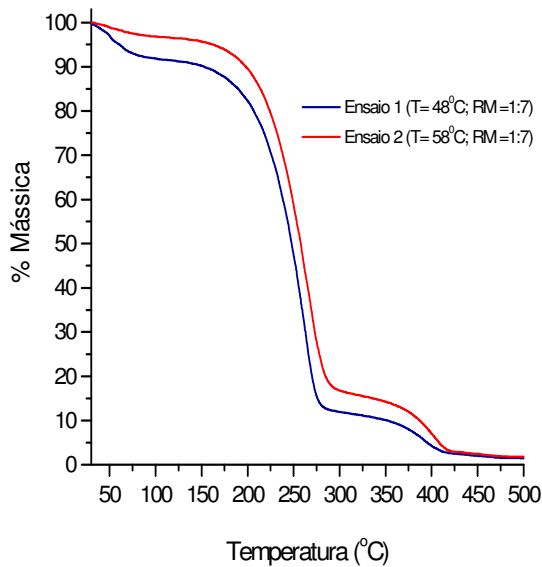


Figura 4.15. Análise termogravimétrica comparativa das amostras de biodiesel sintetizadas pela lipase PS, observando o efeito da temperatura.

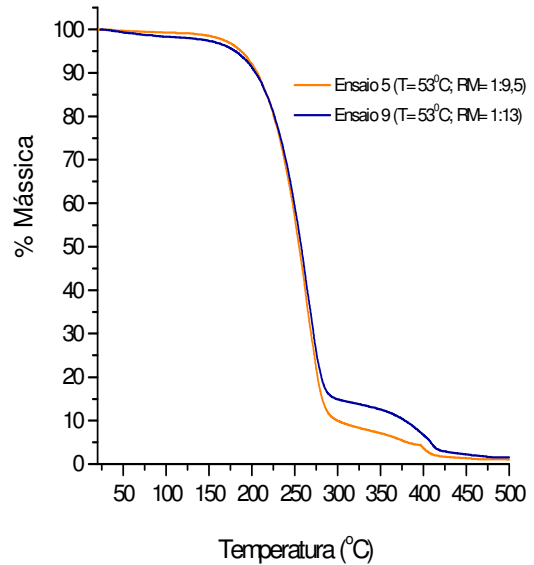


Figura 4.16. Análise termogravimétrica comparativa das amostras de biodiesel sintetizadas pela lipase PS, observando o efeito da razão molar.

Verifica-se na Figura 4.15 a influência da temperatura das reações nos produtos obtidos com relação às curvas de TG. A diferença mais notável foi referente à primeira etapa de degradação térmica, que ocorreu na faixa entre 28 a 90°C, devido aos diferentes teores de água presente nas amostras. Este teor de umidade foi menos acentuado no ensaio 2 devido a utilização de condições mais elevadas de temperatura.

Na Figura 4.16, observa-se à influência da razão molar nos produtos resultantes com relação às curvas de TG. A diferença, neste caso, pode ser associada ao teor de gordura residual referente à terceira etapa de degradação térmica, que ocorreu na faixa de 340-420°C. Na curva referente ao experimento 5, esta terceira etapa de degradação foi praticamente imperceptível indicando que a amostra possui um teor mínimo de gordura residual. Este fato

sugere ainda que experimentos conduzidos em meios reacionais com elevado excesso de etanol tendem a apresentar maiores teores de gordura residuais, e conseqüentemente, um menor rendimento de transesterificação.

4.8- Comprovação do modelo estatístico da síntese de biodiesel catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* e análise do produto obtido

4.8.1- Comprovação do modelo estatístico

A última etapa do trabalho foi direcionada para comprovação do modelo estatístico que representa a região ótima de temperatura e razão molar sebo bovino/etanol para conduzir a síntese de biodiesel catalisada pela lipase PS imobilizada em POS-PVA. Para tanto, um experimento adicional foi efetuado nas condições previstas pelo modelo estatístico em um reator com mesma configuração, porém com maior volume útil de trabalho. Isso permitiu também verificar a interferência do desempenho do biocatalisador selecionado numa ampliação de volume. Esse ensaio foi efetuado com uma massa total de reagentes de 110 g numa razão molar 1:7 (sebo:etanol) a 48°C. O monitoramento da reação foi efetuado pela determinação dos ésteres etílicos formados (Figura 4.17) em amostras retiradas em intervalos de 2 h por um período máximo de 18 h.

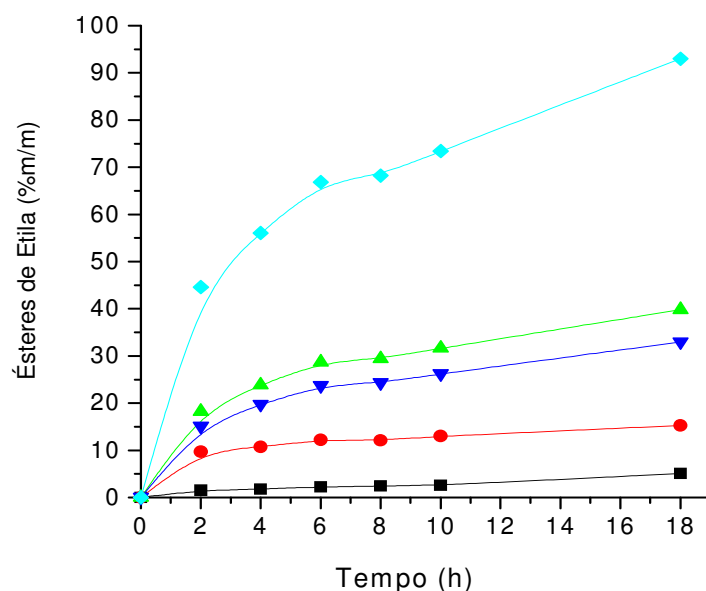


Figura 4.17. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C14; -●-C16, -▲-C18, -▼-C18:1, -◆-Total) na reação de transesterificação do sebo bovino empregando lipase PS imobilizada em POS-PVA nas condições previstas pelo modelo estatístico.

A reação apresentou um perfil de formação de ésteres de etila similar ao obtido anteriormente, alcançando o equilíbrio em 12h de reação. O ponto de verificação do modelo estatístico foi comprovado em 8 h, apresentando um rendimento de 91,62%, enquanto no ensaio proposto no delineamento experimental (item 4.6) esse rendimento foi obtido com 6 h de reação. Este deslocamento pode ser atribuído à ampliação de volume do meio reacional que, de fato, ocasiona um desvio do comportamento esperado (BEEL, 2005).

4.8.2 Comparação das propriedades do biodiesel obtido por vias enzimática e química

As propriedades do biodiesel obtido experimentalmente em escala de bancada por via enzimática foi comparado com as propriedades de uma amostra de biodiesel obtida por rota química e fornecida comercialmente. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.18, que também apresenta as especificações da ANP para o uso do biodiesel.

Tabela 4.18 – Comparação das propriedades do biodiesel e adequação a norma vigente.

	<i>Biodiesel</i>	<i>Biodiesel comercial^a</i>	<i>Especificações ANP</i>
Índice de Acidez (mg KOH/g)	6,27	1,96	0,5
Índice de Iodo (g I₂/g)	33,49	31,99	Max. 120*
Umidade (ppm)	1690,3	1521,3	500 ppm
Viscosidade dinâmica (cP)	6,795	4,665	3-6 cSt

^a Amostra de biodiesel manufaturada em 2007

*Norma EN 14214- Norma Européia (KNOTHE *et al.*, 2006)

O índice de acidez é uma importante alternativa no monitoramento da qualidade do processo de refino do biodiesel, permitindo ainda monitorar a qualidade do combustível armazenado. Dados da literatura indicam que o índice de acidez, bem como a viscosidade, aumentam com o grau de oxidação do biodiesel.

Os resultados apresentados pela Tabela 4.18 indicam que o biodiesel produzido pela via enzimática apresentou um índice de acidez superior ao valor máximo estabelecido pelas especificações da ANP (0,5 mg KOH/g). Esse elevado valor pode ter sido originado da parcela de triglicerídeos, que ao invés de ser transesterificado, foi hidrolisado formando ácidos graxos livres, aumentando a acidez do produto final.

Com relação ao índice de iodo, estudos reportados na literatura indicam que presença de luz, ar, de metais como o cobre e temperaturas de estocagem elevadas são fatores que aceleram o processo de oxidação, bem como reações de polimerização. Contudo, a influência

da estrutura dos ácidos graxos especialmente o grau de insaturação tem se mostrado o efeito mais influente com relação à estabilidade oxidativa e reações de polimerização (KNOTHE *et al.*, 2006). Neste contexto, o índice de iodo pode se enquadrar em uma importante ferramenta para predição da estabilidade oxidativa, visto que este índice está ligado com o grau de insaturação presente na amostra de biodiesel.

O índice de iodo não sofreu alteração significativa quando comparado ao sebo bovino, resultado esperado visto que a transesterificação não altera o perfil de insaturação da matéria prima para o biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006). Este índice é interessante para o biodiesel de sebo bovino, pois a norma alemã estabelece um teto de 115g I₂/g excluindo, com isso, o biodiesel derivado da soja. Neste contexto, o biodiesel derivado de sebo bovino se destaca como um produto de exportação em potencial para o mercado de biocombustíveis europeu (MACHADO, 2008).

O teor de água é um outro parâmetro importante, pois o biodiesel é uma substância muito higroscópica, isto é, absorve água com grande facilidade. A presença de água é prejudicial, pois causa a degradação hidrolítica do combustível. O grande desafio da indústria de biodiesel é manter o produto estocado até sua comercialização dentro das especificações exigidas pela ANP e, portanto, os testes de umidade por Karl Fisher são de grande utilidade.

Os resultados obtidos para teores de água indicam uma quantidade similar de água entre o biodiesel comercial e o biodiesel obtido pela via enzimática. O teor de água estabelecido pela ANP é de 500ppm, portanto, tanto o biodiesel experimental quanto o biodiesel comercial estão fora de especificação. No caso do biodiesel experimental, como se trata de um combustível semipurificado, com uma simples etapa de secagem é possível adequar o produto à especificação exigida.

A viscosidade é um parâmetro importante para a introdução do biodiesel na matriz energética renovável de forma sustentável, ou seja, o combustível deve ser utilizado nos motores atuais sem ocasionar problemas como entupimento do sistema de injeção e formação de borras dentro da câmara de combustão. Os resultados apurados indicam que o valor de viscosidade do biodiesel obtido por via enzimática foi maior do que o biodiesel comercial. Esse valor de viscosidade é devido à presença de mono, di e triglicerídeos no biodiesel, tendo em vista que a conversão total não foi alcançada.

4.8.3 Análise termogravimétrica

A Figura 4.18 apresenta o gráfico de TG e DTG correspondente à amostra de biodiesel obtido com a reação de comprovação do modelo estatístico. O produto transesterificado

apresentou dois estágios de degradação térmica. O primeiro estágio ocorreu na faixa de temperatura de 119-270°C, com perda de massa de 81%, referente a degradação dos ésteres etílicos. O segundo estágio ocorreu na faixa de 270-422°C, referente a mono, di e triglicerídeos que não foram convertidos a ésteres, confirmando os dados apresentados na Tabela 4.18. A utilização de TG, embora estabeleça uma relação com a estabilidade térmica, tem sido usada também na análise quantitativa (CHAND *et al.*, 2009).

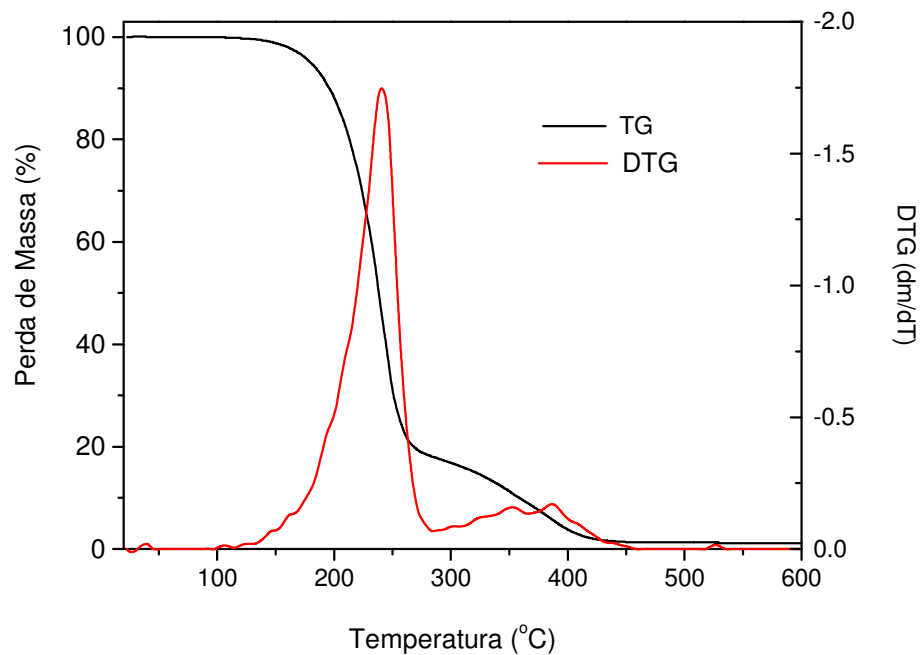


Figura 4.18. Análise termogravimétrica da amostra de biodiesel obtido com na reação de comprovação do modelo estatístico (48°C e razão molar 1:7 sebo/etanol) empregando a lipase PS como catalisador.

4.9- Análise da viabilidade técnica da produção de biodiesel derivado de sebo bovino

O sebo bovino constitui-se uma alternativa efetiva para a produção de biodiesel devido à disponibilidade crescente desta matéria-prima, visto que o Brasil ocupa a primeira posição mundial entre os países exportadores de carne bovina. Além disso, tendo em vista que a matéria-prima representa mais de 80% dos custos de um processo de síntese de biodiesel, o sebo bovino, por apresentar um baixo custo no mercado interno, ocupa uma posição de destaque entre as fontes alternativas de matérias-prima para a produção desse biocombustível (FILHO, 2007; KNOTHE *et al.*, 2006).

A transesterificação enzimática do sebo bovino com etanol demonstrou grande potencial para produção de biodiesel. Contudo, são necessários cuidados com relação a alguns parâmetros críticos apresentados nessa reação química, como por exemplo, a elevada viscosidade do sebo bovino devido ao alto teor de ácidos graxos saturados presentes nesta matéria prima. Portanto, especial atenção deve ser dada ao comportamento dessa propriedade durante da reação, correlacionando com o rendimento da transesterificação.

Por meio da coleção dos dados apresentados, a utilização de um planejamento experimental, bem como a comprovação desse modelo, apresentaram dados coerentes. Porém, a escolha do rendimento de transesterificação como única variável resposta não foi suficiente para o entendimento do mecanismo que governa a reação de transesterificação.

Nesse contexto, recomenda-se adotar duas variáveis respostas na análise estatística de planejamentos experimentais visando uma otimização desta específica reação, tais como viscosidade e rendimento de transesterificação delimitando a região para otimização para valores de rendimentos superiores a 99% e viscosidade inferiores 5 cP.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a transesterificação do sebo bovino para sua utilização como combustível alternativo ao diesel convencional, utilizando lipase imobilizada como biocatalisador. Os resultados obtidos foram promissores, entre os quais podem ser destacadas as seguintes metas alcançadas:

1. Dentre as cinco preparações de lipases testadas na reação de interesse deste projeto, as lipases de *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas fluorescens*, ambas imobilizadas em POS-PVA ativado com epícloridrina, foram as que apresentaram velocidades de reação mais elevadas, revelando rendimentos elevados, respectivamente, da ordem de 99,78% e 93,26% em 48h.
2. Os produtos obtidos da transesterificação pela atuação dessas lipases (PS e AK) foram submetidos às análises de viscosidade, termogravimetria, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e RMN ^1H . Com base nos resultados dessas análises, foi possível inferir que o biodiesel obtido com a lipase PS apresentou um melhor conjunto de propriedades quando comparado com o biodiesel obtido com a lipase AK.
3. Levando-se em conta a pureza do produto obtido, foi selecionada a preparação de Lipase PS imobilizada em POS-PVA como derivado mais efetivo para mediar a reação de síntese de biodiesel a partir do sebo bovino.
4. A aplicação de técnicas auxiliares de caracterização das propriedades do produto transesterificado, em especial a termogravimetria que pode ser utilizada não somente para determinar a estabilidade térmica mas também para monitorar o progresso da reação de transesterificação.
5. As características bioquímicas (pH e temperatura) e cinéticas (K_m e V_{max}) do sistema imobilizado selecionado foram determinadas por meio de um estudo comparativo entre lipase livre e imobilizada. Foram observadas modificações no pH ótimo da enzima imobilizada para valor mais elevado de pH (8,9) numa ampla faixa da temperatura (36 a 58°C) quando comparados com a enzima na sua forma livre (pH = 7,5 e temperatura = 50 °C). O estudo da influência da concentração de substrato na velocidade de reação mostrou um bom ajuste do modelo de Michaelis-Menten aos pontos experimentais, com estimativa dos seguintes valores para V_{max} (56441 U/g para lipase livre e 3873 U/g para a lipase imobilizada) e K_m (4018 mM para lipase livre e 1883 mM para a lipase imobilizada). Este derivado foi 17 vezes mais estável termicamente que a lipase na forma livre.

6. Empregando o derivado imobilizado selecionado (PS imobilizada em POS-PVA) as condições reacionais (temperatura e razão molar) da transesterificação enzimática do sebo bovino foram otimizadas, sendo constatada uma influência negativa tanto da temperatura quanto da razão molar para o rendimento da reação, o que do ponto de vista econômico é um resultado atraente visto que temperatura baixa significa menor energia empregada no processo e razão molar baixa significa menor excesso de reagentes (etanol).
7. Adotando as condições preditas (razão molar 1:7 (sebo:etanol) a 48°C) pelo delineamento experimental, a comprovação do modelo estatístico foi realizada em reator com aumento de escala de três vezes, obtendo-se um rendimento coerente com o resultado predito, da ordem de 91,62% de conversão em 8 h de reação.
8. As propriedades do produto transesterificado e semi-purificado não atenderam às normas estabelecidas pela ANP para uso como combustível, principalmente em relação a viscosidade, sendo necessário um estudo de otimização desta reação em função de vários parâmetros de controle, tais como viscosidade, rendimento de transesterificação e estabilidade térmica (termogravimetria).
9. A comparação do biodiesel experimental, obtido pelo processo enzimático e do biodiesel comercial foi feita e mostrou uma boa similaridade das propriedades indicando que a síntese enzimática é um processo promissor, pois pode originar um produto refinado submetido a menor número etapas de purificação.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar o programa Design expert para definir as condições operacionais de transesterificação do sebo bovino impondo critérios a serem alcançados: a) rendimento de transesterificação > 99%; b) viscosidade do produto transesterificado < 5 cP; c) perda de massa por termogravimetria $\geq 95\%$.
- Estruturar um sistema de reatores que permitam aumentar a produtividade e estabilidade operacional do biocatalisador;
- Avaliar custos do processo enzimático visando à implementação de um processo contínuo de obtenção de biodiesel.

REFERÊNCIAS

AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995–9005, 2007.

ALBUQUERQUE, M. C. G.; MACHADO, Y. L.; TORRES, A. E. B.; AZEVEDO, D. C. S.; CAVALCANTE Jr, C. L.; FIRMIANO, L. R.; PARENTE Jr., E. J. S. Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. **Renewable Energy**, v.34, p. 857-859, 2009.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. **AOCS Press**, 5th ed., 2004.

ANDERSSON, M.; ADLERCREUTZ, P. Evaluation of simple enzyme kinetics by response surface modeling. **Biotechnology Letters**, v.13, p.903-907, 1999.

ANP; Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, dados estatísticos. Disponível em <http://www.anp.gov.br/petro/dados_estatisticos.asp> Acesso em 5 mai. 2009.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

ANTT-Agência Nacional de Transportes Terrestres, Acesso em 06 mai. 2009. Disponível em <http://www.antt.gov.br/rntrc_numeros/rntrc_porestado.asp>, 2009.

BAKO, K. B.; KOVA, F. C. S.; GUBICZA, L.; HANSCO, J. K. Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent free system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.20, n. 6, p.437- 439, 2002.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392 – 416, 1996.

BEEL, T. A. Challenges in the scale-up of particulate processes-an industrial perspective. **Powder Technology**, v.150, p.60-71, 2005.

BILLAUD, F.; DOMINGUEZ, V.; BROUTIN, P. Chemical evaluation of fatty acid methyl esters and study on the pyrolysis of methyl stearate. **Oleagineux, Corps Gras, Lipides**, v.2, n. 6, p.483-490, 1995.

BIODIESELBR. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/i/biodiesel/biodiesel-brasil-potencial.jpg>> Acesso em 06 mai. 2009

BOYACI, I. H. A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology. **Biochemistry Engineering Journal** v. 25, p.55-62, 2005.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRADSHAW, G. B.; MEULY, W. C. Preparations of detergents. US Patent 2, p.360-844, 1944.

BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J.L.; MELO, E. H. M.; DE CASTRO, H. F. Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehe* immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 113/117, p.189-200, 2004.

CANDEIA, R. A.; FREITAS, J. C. O.; SOUZA, M. A. F.; CONCEIÇÃO, M. M.; SANTOS, I. M. G.; SOLEDADE, L. E. B.; SOUZA A. G. Thermal and rheological behavior of diesel and methanol biodiesel blends. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87 n. 3, p.653-656, 2007.

CHAND P.; REDDY C. V.; VERKADE J. G.; WANG T.; GREWEEL D. Thermogravimetric quantification of biodiesel produced via alkali catalyzed transesterification of soybean oil. **Energy & Fuels**, v.23, p.989-992, 2009.

CHANG, Y. Z. D.; GERPEN, V.H.J.; LEE, I.; JOHNSON, A.L.; HAMMOND, G. E.; MARLEY, J.S. Fuel properties and emissions of soybean oil esters as diesel fuel. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.73, p.1549-1555, 1996.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2008. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/mconabweb/index.php?PAG=73&NSN=750>> Acesso em 13 nov. 2008.

CONCEIÇÃO, M. M.; FERNANDES JR, V. J.; BEZERRA, A. F.; SILVA, M. C. D.; SANTOS, I. M. G.; SILVA, F. C.; SOUZA, A. G. Dynamic kinetic calculation of castor oil biodiesel. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.87 n. 3, p.865-869, 2007.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v.23, n.4, p.531-537, 2000.

DA RÓS, P. C. M., **Etanolise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena – EEL-USP, Lorena, Brasil. Disponível em <www.eel.usp.br> Acesso em 06 mai. 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of lipases immobilized on polymers. **Química Nova**, v. 27, n.4, p.623-630, 2004.

DANTAS, M. B.; ALMEIDA, A. A. F.; CONCEIÇÃO, M. M.; FERNANDES JR, V. J.; SANTOS, I. M. G.; SILVA, F. C.; SOLEDADE, L. E. B.; SOUZA A. G. Characterization and kinetic compensation effect of corn biodiesel. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.87, n.3, p.847-851, 2007-a.

DANTAS, M. B.; CONCEIÇÃO, M. M.; FERNANDES JR, V. J.; SANTOS N. A.; ROSENHAIM, R.; MARQUES, A. L. B.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA A. G. Thermal and kinetic study of corn biodiesel obtained by the methanol and ethanol routes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.87, n.3, p.835-839, 2007-b.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D. Lipase catalyzed transesterification of soybean oil of biodiesel production during continuous batch operation. **Journal of Applied Biochemistry & Biotechnology**, v.38, p.103-106, 2003.

DUARTE, A. O peso da matéria prima. **Biodieselbr**, v.9, p.19, 2009.

DUNN, R. O. Oxidative stability of biodiesel by dynamic mode pressurized-differential scanning calorimetry (P-DSC). **Transactions of the Asabe**, v.49, n.5, p.1633-1641, 2006.

FALEIROS, E. L. **Biodiesel plantas contínuas, custos e rendimentos**. Palestra apresentada no SIMTEC, Piracicaba-SP, 2007.

FERRARI, R. A. P.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Estabilidade oxidativa de biodiesel de ésteres etílicos de ácidos graxos de soja. **Scientia Agrícola**. v.62, n.3, p.291-295, 2005.

FEUGE, R. O., GROSE, T. Modification of vegetables oil with ethanol. **Journal American Oil Chemists Society**, v.26, p.97-102, 1949.

FILHO, M. G. **Aspectos técnicos e econômicos da produção do biodiesel: O caso do sebo bovino como matéria prima**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Energia. Universidade Salvador – UNIFACS, Salvador-BA, 2007.

FILLIERES, R.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; DELMAS, M. Ethanolysis of rapeseed oil: Quantitation of ethyl esters, mono-, di-, triglycerides and glycerol by high performance size-exclusion chromatography. **Journal American Oil Chemists Society**, v.72, p.427-432, 1995.

FIRESTONE, D. Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes. 2^a ed., Washington-D.C: **AOCS PRESS**, p.204, 2006.

FISCHER, G.; SCHRATTENHOLZER, L. Global bioenergy potentials through 2050. **Biomass & Bioenergy**, v.20, n.3, p.151-159, 2001.

FOGLIA, T. A.; NELSON, L. L.; MARMER, W. N. Productions of biodiesel, lubricant additives. Patente dos E.U.A. nº 5,713,965, 1998.

FREEDMAN, B.; BAGBY, M. O. Diesel engine fuels from vegetable oils. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.66, p.1601, 1989-a.

FREEDMAN, B.; BAGBY, M. O. Heats of combustion of fatty esters and triglycerides. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 66, p.1601-1605, 1989-b.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.63, n. 10 p.1375-1380, 1986.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty ester from transesterified vegetable oils. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.61, p.1638-1643, 1984.

FREITAS, L. **Seleção de rota enzimática para produção de monoglicérides empregando lipase imobilizada em matriz obtida pela técnica sol-gel**. 2006. 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

FREITAS, S. P.; SILVA F.C.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Efeito de enzimas hidrolíticas no comportamento reológico do óleo de palma cru. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, p.127-130, 1998.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils-Review. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.5, p.405-416, 2001.

GILL, I.; BALLESTEROS, A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: An efficient and generic approach. **Journal of the American Chemical Society**, v.120, n.34, p.8587-8598, 1998.

GROSSLEY, T. D.; HEYES, T. D.; HUDSON, B. J. F. The effect of heat on pure triglycerides. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.39, p.9-14, 1962.

HAAS, M. J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: Vegetable oil soapstock. **Fuel Processing Technology**, v.86, p.1087-1096, 2005.

HASSEL R.L. Thermal analysis – Alternative method of measuring oil stability. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 53, n 5, 179-181, 1976.

HSU, A.; JONES, K; MARMER, W. N.; FOGLIA, T. A. Production of alkyl esters from tallow and grease using lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p.585–588, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3^a ed. São Paulo, 1985, p.533, v. 1.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p.53-58, 2001.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v.91, p.12-15, 2000.

KEELING-TUCKER, T.; RAKIC, M.; SPONG, C.; BRENNAN, J. D. Controlling the material properties and biological activity of lipase within sol-gel derived bioglasses via organosilane and polymer doping. **Chemistry of Materials**, v.12, p. 3695-3704, 2000.

KLOPFENSTEIN, W. E. Effect of molecular weights of fatty acid esters on cetane numbers as diesel fuels. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.62, p.1029-1031, 1985.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structures of fatty acid alkyl esters. **Fuels Processing Technology**, v.86, p.1059-1070, 2005.

KNOTHE, G., MATHEAUS, A. C., RYAN III, T. W. Cetane numbers of branched and straight chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, v.82, p.971-975, 2003.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**, 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KRISNANGKURA, K.; SIMAMAHARNNOP, R. Continuous transmethylation of palm oil in a organic solvent. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.69, p.166-169, 1992.

LANGONE M.A.P, SANT'ANNA G. L. Enzymatic synthesis of medium-chain triglycerides in a solvent-free system. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 77-9, p.759-763, 1999.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS Jr., J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel de babaçu obtido por via etanólica. **Química Nova**, v.30, n.3, p.600-603, 2007.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: A Review. **Bioresource Technology**, v.70, p.1-15, 1999.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.32, p.38-46, 2004.

MACHADO, P. **Biodiesel brasileiro tipo exportação**. Biodieselbr. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/biodiesel-brasileiro-tipo-exportacao-17-11-08.htm>>, Acesso em 07 mai. 2009, 2008.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.11, p.1300-1311, 2007.

MEHER, L.C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification- A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, p.248-268, 2006.

MENDES, A. A.; VIEIRA, F. C. V.; DE CASTRO, H. F. Produção de biodiesel por interesterificação de óleo de babaçu e butanol catalisada por lipase imobilizada em suporte híbrido In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 16., 2006, Santos. Lorena: EEL, 2006. v.1. p.1 – 7, 2006.

METZGER, O. J. Organic reactions with oils and fats as renewable raw materials for the chemist industry. **Chemosphere**, v.43, p.83-87, 2001.

MITTLEBACH, M. Lipase catalysed alcoholysis of sunflower oil. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.67, p.168-170, 1990.

MIYAKE, Y., YOKOMIZO, K., MATSUZAKI, N. Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.75, p.1091–1094, 1998.

MONTEIRO, M. R.; AMBROZINI, A. R. P.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, v.77, p.593-605, 2008.

MOREIRA, A. B. R. **Seleção de fonte de lipase para síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena – USP. Lorena-SP, 120 p., 2007.

MOREIRA, A. B. R., PEREZ, V.H., ZANIN, G.M., CASTRO, H.F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy and Fuels**, v.21, p.3689-3694, 2007.

MOTHÉ, C. G.; CORREIA, D. Z.; CASTRO, B. C. S.; CAITANO, M.; ARANDA, D. A. G. Biodiesel obtido a partir de rejeito de gordura animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2., p.743-747, 2005.

MOURA, K. R. M.; SILVA, F. C.; BRANDÃO, K. S. R.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M. Estabilidade térmica do sebo bovino e do biodiesel metílico e caracterização físico-química. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA-CBRATEC, 5., p.207-212, 2006.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiment**, 1.ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1995.

NELSON, L. L.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal American Oil Chemists Society**, v.73, p.1191-1195, 1996.

NOUREDDINI, H.; ZHU, D. Kinetics of transesterification of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, n.11, p.1457-1463, 1997.

OLIVEIRA, L. B.; COSTA, A. O. **O Biodiesel, uma proposta de desenvolvimento sustentável**, 2001. Disponível em: <<http://www.ivig.coppe.ufrj.br/doc/biodiesel.pdf>> Acesso em 5 mai. 2009.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; SILVA, J. L.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, DOI: 10.1007/s12010-009-8578-z, 2009.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; DE CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, p. 35-40, 2008.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n.3, 281-288, 2007.

PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 4, p. 343-355, 2003.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6, p.1313-1330, 2005.

PNPB, **Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel**, 2008, disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/programa.html>> Acesso em 21 jan. 2009.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, v.31, p.28-37, 2003.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAM, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v.99, p.3975-3981, 2008.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; VIJAYAKRISHNAN, V.; SCHIMOSSEK, K. Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: Magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.134, p. 251-258, 1998.

ROZYCKI, K.; KIJENSKI, J. A.; WALISIEWICZ-NIEDEBALSKA, W.; LIPKOWSKI, A. W. Use of enzymatic catalysis for making biodiesel. **Przemysł Chemiczny**, v. 85, p. 1592-1593, 2006.

SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of butyl butyrate using a factorial design. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n.10, p. 1007-1011, 2006.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.52-53, p.49-57, 2008.

SANTOS, N. A.; TAVARES, M. L. A.; ROSENHAIM, R.; SILVA, F. C.; FERNANDES Jr., V. J.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Thermogravimetric and calorimetric evaluation of babassu biodiesel obtained by the methanol route. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.87, n.3, p.649-652, 2007.

SCHUCHARDT, U.; SERCHEL, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: A review. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SCHWAB, A. W.; BAGBY, M. O.; FREEDMAN, B. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oil. **Fuel**, v. 66, p.1372-1378, 1987.

SHEEHAN, J.; DUFFIELD J.; GRABOSKI, M.; SHAPOURI, H. **Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus**. National Renewable Energy Laboratory for U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development and U.S. Department of Agriculture's Office of Energy, p.286, 1998.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetables oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, p.789-793, 1999.

SILVA, G. S.; VIEIRA, F. C. V.; CASTRO, H. F. Transformação enzimática do óleo de palma visando a obtenção de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA, 6 (COBEC-IC), 2006, Campinas-SP. **Cadernos de Programação e Resumos**. Campinas-SP: UNICAMP, v. 1, p. 34-34, 2005.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.79, p. 745-757, 1999.

SRIVASTAVA, A., PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainability, Energy**, v.4, p.111–133, 2000.

STUART, B., GEORGE, W. O., MCINTYRE, P. S. In: Modern Infrared Spectroscopy, ed. D. J. Ando. England: John Wiley & Sons, p. 117-119, 1996.

TANG, H.; WANG, A.; SALLEY, S. O.; SIMON, K. Y. N. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.85, p.373-382, 2008.

ULTRAPERIFERIAS, 2008. Disponível em: <<http://ultraperiferias.blogspot.com/2008/05/petrleo-no-mundo.html>> Acesso em 14 nov. 2008.

URIOSTE, D. **Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, FAENQUIL, Lorena-SP, 107 p, 2004.

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v.31, n.2, p.407-412, 2008.

VARESE, R.; VARESE, M. Methyl ester biodiesel: Opportunity or necessity? **Journal American Oil Chemists' Society**, v.7, p.816-824, 1996.

VASUDEVAN, P.T., BRIGGS, M. Biodiesel production – Current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35, p. 421-430, 2008.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: A comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, p.297–305, 2004.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.77, p.355-360, 2000.

WEAST, R. C.; **Handbook of chemistry and physics**, 66^a ed., p.D272, 1986.

WENDHAUSEN, P. A. P.; RODRIGUES, G. V.; MARCHETTO, O. **Análises Térmicas. Graduação em Engenharia de Materiais**, Universidade Federal de Santa Catarina, Disponível em: <www.materiais.ufsc.br/Disciplinas/EMC5733/Apostila.pdf> Acesso em 06 mai. 2009.

WU, W. H., FOGLIA, T. A., MARMER, W. N., DUNN, R. O., GORING, C. E., BRIGGS, T. E. Low-temperature properties and engine performance evaluation of ethyl and isopropyl esters of tallow grease. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.75, p.1173-1178, 1998.

WU, W. H.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. M.; PHILLIPS, J. G. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, p.517-521, 1999.

WUST, E. **Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau – FURB. Blumenau- SC, 2004.

YAHYA, A.; MARLEY, S. J. Physical and chemical characterization of methyl soy oil and methyl tallow esters as CI engine fuels. **Biomass & Bioenergy**, v.6, p.321-328, 1994.

YAMANE, K.; UETA, A.; SHIMAMOTO, Y. Influence of physical and chemical properties of biodiesel fuel on injection, combustion and exhaust emission characteristics in a DI-CI engine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIAGNOSTICS AND MODELING OF COMBUSTION IN INTERNAL COMBUSTION ENGINES, 5., p.402-409, 2001.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. (ed.) **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, Cap. 4. p.35-85, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)